

Rolle des angeborenen Immunsystems in der Colitispathogenese bei MDR1A-Defizienz

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Birgit Ey

aus München
September 2011

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essens und der Universität Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe "Gastrointestinale Immunologie" unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Elke Cario durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Elke Cario

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Bertram Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2012

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil finanziell gefördert durch:

- Crohn's and Colitis Foundation of America – CCFA
(SRA #1790; RFP # 3191; E. Cario)
- Deutsche Forschungsgemeinschaft – DFG
(Sachbeihilfen; E. Cario)
- Interne Forschungsförderung – IFORES
(Bonusprogramm; E. Cario)

Teile der vorliegenden Dissertation wurden zuvor publiziert oder auf Kongressen präsentiert.

1. Originalarbeiten

- 1) **Ey B+**, Eyking A+, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2009) TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through Connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. (+Ko-Erstautoren, in alphabetischer Reihenfolge)
J Biol Chem 284(33):22332-22343.
- 2) **Ey B**, Eyking A, Salzman N, Göthert JR, Rünzi M, Schmid KW, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2012) Loss of TLR2 worsens spontaneous colitis in MDR1A deficiency through commensal-induced pyroptosis.
Manuskript in Revision

2. Präsentationen

* : markiert Referent

- 1) **Ey B***, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2009) Oral therapy with a TLR2 agonist protects against chronic intestinal inflammation in a murine model of epithelial barrier dysfunction. Eur J Immunol Suppl: S241 (**Poster auf Englisch**; 2nd European Congress of Immunology, Berlin)
- 2) **Ey B+**, Eyking A+, Gerken G, Podolsky DK, Cario E* (2009) TLR2-mediated control of gap junctional intercellular communication essentially contributes to intestinal epithelial barrier homeostasis during acute and chronic colitis. Inflamm. Bowel Dis. 15 Suppl: S46 (**Vortrag auf Englisch**; 2009 Advances in IBD – Crohn's and Colitis Foundation of America (CCFA); National Clinical & Research Conference; + Ko-Erstautoren)

-
- 3) **Ey B**, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E* (2010) Deletion of TLR2 promotes TH1-mediated inflammation in MDR1A deficiency. Journal of Crohn's and Colitis 4 Suppl:S25 (**Vortrag auf Englisch**; 5th International Meeting on Inflammatory Bowel Diseases)
 - 4) **Ey B***, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2010) Deletion of TLR2 promotes TH1-mediated inflammation in MDR1A deficiency. Gastroenterology 138:S88-S89. (**Vortrag auf Englisch**; Digestive Disease Week 2010; Annual Meeting – American Gastroenterological Association, New Orleans)
 - 5) **Ey B***, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2010) Deletion von TLR2 triggert TH1-vermittelte intestinale Entzündung in MDR1 α -defizienten Mäusen. Z Gastroenterol 48:873. (**Vortrag auf Deutsch**; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten – Viszeralmedizin 2010, Stuttgart)
 - 6) **Ey B***, Gerken G, Podolsky DK, and Cario E (2011) IL-1R/MyD88 signalling mediates severity of UC-like pancolitis in TLR2/MDR1A double deficient mice. Gastroenterology 140(5):S-143-S-144 (**Vortrag auf Englisch**; Digestive Disease Week 2011; Annual Meeting – American Gastroenterological Association, Chicago)
 - 7) **Ey B***, Gerken G, Podolsky DK, and Cario E (2011) TLR2 Protects Against Commensal-dependent Pancolitis Exacerbation in MDR1A Deficiency. (**Poster auf Englisch**; 15th International Congress of Mucosal Immunology 2011, Paris)
 - 8) **Ey B***, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2011) Deletion von TLR2 triggert TH1-vermittelte intestinale Entzündung in MDR1 α -defizienten Mäusen. (**Vortrag auf Deutsch**; Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (DACED) 2011, Mainz)
 - 9) **Ey B***, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E (2011) Deletion of TLR2 promotes TH1-mediated inflammation in MDR1A deficiency. (**Vortrag auf Englisch**; ESPGHAN Basic Science Workshop 2011, Budapest)

Auszeichnungen (zu Teilen der Promotionsarbeit)

- 2011 ***Abstract Student Price Award***, American Gastroenterological Association (AGA)
- 2009 ***Best Overall Abstract Award, Co-Author***, Crohn's and Colitis Foundation of America (CCFA)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	14
Abkürzungsverzeichnis	15
1 Einleitung	21
1.1 Aufbau des Colons	21
1.2 Mukosales Immunsystem	22
1.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)	23
1.2.2 Intestinales Epithel	26
1.2.3 Pumpen/ABC-Transporter	27
1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	28
1.3.1 Allgemeine Kennzeichen der CED	28
1.3.2 CED-beeinflussende Faktoren	29
1.3.3 Therapiemöglichkeiten	30
1.4 Murine Colitismodelle	31
1.5 Zielsetzung	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte	33
2.1.1 Materialien	33
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien	35
2.1.3 Enzyme	39
2.1.4 Ladder & Marker	40
2.1.5 Geräte	40
2.1.6 Lösungen und Puffer	42

2.1.7	Kits	44
2.1.8	Primer	45
2.1.9	Antikörper.....	47
2.1.10	Software	49
2.2	Methoden	50
2.2.1	Mäuse und Tierhaltung	50
2.2.2	Genotypisierung.....	51
2.2.3	Mauspräparation und Gewebeisolation.....	55
2.2.4	Histologie	56
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	58
2.2.6	Genexpressionsanalyse.....	59
2.2.7	Proteinexpressionsanalyse	62
2.2.8	Zellisolation und Zellkultur.....	65
2.2.9	Durchflusszytometrie	69
2.2.10	Serumanalyse.....	71
2.2.11	Therapieansätze	71
2.2.12	Statistik.....	72
3	Ergebnisse	73
3.1	Regulation der TLR-mRNA-Expression in Colitis von MDR1A KO-Mäusen	73
3.2	Genotypisierung der unterschiedlichen KO-Mausstämme.....	74
3.3	Phänotypisierung der unterschiedlichen KO-Mausstämme im Verlauf	76
3.3.1	Klinische Parameter	76
3.3.2	Histopathologie des Colons	79
3.3.3	Identifizierung der Leukozyten in der entzündeten Lamina Propria	81
3.3.4	Beteiligung der Leber als systemische Folge.....	85
3.3.5	mRNA-Genexpression von Defensinen im Ileum.....	87
3.3.6	mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen im Colon	88
3.3.7	Proteinexpression von Zyto- und Chemokinen im Colon	93

3.3.8	Basal-Sekretion von Zyto- und Chemokinen in isolierten Pan-T-Lymphozyten aus der Lamina Propria des Colons	94
3.3.9	ZO-1-assoziierte Integrität der intestinalen epithelialen Barriere.....	96
3.3.10	IL-1 β -Proteinproduktion in der Lamina Propria des Colons	97
3.3.11	Wesentliche Ergebnisse zum Phänotyp der unterschiedlichen Mausstämme	99
3.4	Rolle der kommensalen Bakterienflora in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	99
3.4.1	Klinische Parameter nach Antibiose	100
3.4.2	Histopathologie des distalen Colons nach Antibiose.....	103
3.4.3	mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen nach Antibiose.	105
3.4.4	Effekte von Antibiose auf die Rekrutierung von CD11b ⁺ -Zellen und IL-1 β -Produktion	109
3.4.5	Effekte von Antibiose auf die Rekrutierung von CD4 ⁺ -Zellen	110
3.4.6	Wesentliche Ergebnisse zur Rolle der kommensalen Bakterienflora ..	111
3.5	Funktionelle Rolle der CD11b ⁺ -Zellen in der Colitisprogression in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	112
3.6	Rolle des IL-1 β -Signalweges via MyD88 in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	115
3.6.1	Klinische Parameter nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88	115
3.6.2	Histopathologie des Colons nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88...	118
3.6.3	mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88	120
3.6.4	Rekrutierung von CD11b ⁺ -Zellen und IL-1 β -Produktion nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88	123
3.6.5	Wesentliche Ergebnisse zur Rolle des IL-1 β -Signalweges via MyD88 in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO.....	124
3.7	Behandlung von MDR1A KO-Mäusen mit einem TLR2-Liganden	125
3.7.1	Klinische Parameter nach PCSK-Behandlung	125

3.7.2	Histopathologie des distalen Colons nach PCSK-Behandlung	126
3.7.3	mRNA-Genexpression von Zytokinen nach PCSK-Behandlung	128
3.7.4	Proteinexpression von Zytokinen und Chemokinen nach PCSK-Behandlung	129
3.7.5	Analyse der Barriereintegrität nach PCSK-Behandlung	130
3.7.6	Wesentliche Ergebnisse zur Behandlung mit einem TLR2-Liganden .	134
3.8	Rolle des C57BL6/J-Hintergrundes auf die Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	134
3.8.1	Klinische Parameter.....	134
3.8.2	Histopathologie des Colons	136
4	Diskussion	138
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	153
6	Summary and future perspective.....	154
7	Literaturverzeichnis	155
	Danksagungen	166
	Lebenslauf.....	167
	Erklärung	168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Histologischer Aufbau des Colons im Querschnitt.....	22
Abb. 1.2 TLRs und ihre Liganden (entnommen aus (Takeda und Akira 2004))......	24
Abb. 1.3 TLR-Signalweg (entnommen aus (Takeda und Akira 2004)).	25
Abb. 1.4 CED-Ätiopathogenese (entnommen aus (Xavier und Podolsky 2007))......	30
Abb. 2.1 Präparation des Colons (ohne Caecum).	56
Abb. 2.2 Western-Blot-Aufbau	64
Abb. 3.1 mRNA-Genexpression von verschiedenen TLRs im entzündeten Colon von MDR1A KO-Mäusen im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen.	73
Abb. 3.2 Genotypisierung von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO-, MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen mit PCR.	75
Abb. 3.3 Klinische Parameter von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen.....	78
Abb. 3.4 Histopathologie der Colitisentwicklung in den unterschiedlichen KO-Mausstämmen im Alter von 5 und 10 Wochen.	80
Abb. 3.5 Histopathologie der Kennzeichen fulminanter Colitisaktivität in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	81
Abb. 3.6 Charakterisierung unterschiedlicher Leukozyten-Gruppen im Colon der verschiedenen Mausstämmen.....	84
Abb. 3.7 Histopathologie der Leber von WT, MDR1A und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	86
Abb. 3.8 mRNA-Genexpression von Defensinen im Ileum von 10 Wochen alten Mäusen.....	88
Abb. 3.9 mRNA-Genexpression von CD3 im distalen Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.....	89
Abb. 3.10 mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17 Zytokinen im Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.....	91
Abb. 3.11 mRNA-Genexpression von CCL2 im Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.....	92
Abb. 3.12 “ <i>Tight junction</i> ”-Integrität in gesunden WT, MDR1A KO und TLR2/MDR1A dKO.....	96
Abb. 3.13 IL-1 β -Proteinproduktion im Colon der verschiedenen Mausstämmen.....	98

Abb. 3.14 Charakterisierung der IL-1 β -produzierenden Zellen in der intestinalen LP von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	99
Abb. 3.15 Effekt der Antibiotika-Behandlung auf die klinischen Parameter in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	102
Abb. 3.16 Effekt der <i>prophylaktischen</i> vs. <i>therapeutischen</i> Antibiotika-Behandlung auf die Histopathologie des Colons in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	104
Abb. 3.17 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die mRNA-Genexpression von CD3 in TLR2/MDR1A dKO-Colon.	105
Abb. 3.18 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Th1-Polarisierung im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	107
Abb. 3.19 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die mRNA-Genexpression von CCL2 im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	108
Abb. 3.20 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Rekrutierung von CD11b ⁺ - und IL-1 β ⁺ -Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.	110
Abb. 3.21 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Rekrutierung von CD4 ⁺ -Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.	111
Abb. 3.22 CD11b-Expression von adhärenen Peritoneal-Zellen.	113
Abb. 3.23 Western-Blot-Analyse von LPS-stimulierten MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Peritoneal-Makrophagen.	114
Abb. 3.24 Effekte der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die klinischen Parameter in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	117
Abb. 3.25 Effekte der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Histopathologie des Colons von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	119
Abb. 3.26 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die mRNA-Genexpression von CD3 in TLR2/MDR1A dKO-Colongewebe.	120
Abb. 3.27 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Th1-Polarisierung im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	122
Abb. 3.28 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die mRNA-Genexpression von CCL2 im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.	123
Abb. 3.29 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Rekrutierung von CD11b ⁺ - und IL-1 β ⁺ -Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.	124
Abb. 3.30 Effekte der PCSK-Behandlung auf die klinischen Parameter in MDR1A KO-Mäusen.	126

Abb. 3.31 Effekte der PCSK-Behandlung auf die Histopathologie des Colons von MDR1A KO-Mäusen.....	127
Abb. 3.32 Effekte der PCSK-Behandlung auf die Expression von “ <i>tight/gap junction</i> ”-Proteinen.....	132
Abb. 3.33 Analyse des Gesamtproteingehaltes an Cx43.....	133
Abb. 3.34 Auswirkungen des genetischen Hintergrundes auf die klinischen Parameter von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	135
Abb. 3.35 Auswirkungen des genetischen Hintergrundes auf die Histopathologie des Colons von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.....	137
Abb. 4.1 Mögliche Mechanismen der TLR2/MDR1A dKO-Colitis.....	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Primer zur Genotypisierung	45
Tabelle 2.2 Primer zur Realtime qRT-PCR.....	46
Tabelle 2.3 Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen.....	47
Tabelle 2.4 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen	48
Tabelle 2.5 Primäre Antikörper für die Western-Blot-Analyse.....	48
Tabelle 2.6 Sekundäre Antikörper für die Western-Blot-Analyse.....	49
Tabelle 2.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie	49
Tabelle 2.8 Mäusstämme	51
Tabelle 2.9 Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCRs	53
Tabelle 2.10 Kriterien für den Histologie-“Score”	57
Tabelle 3.1 Serumwerte der verschiedenen Mäusstämme.....	87
Tabelle 3.2 Proteinexpressionsanalyse von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren im Colon von 5 Wochen alten Mäusen.	94
Tabelle 3.3 Proteinexpressionsanalyse von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren in Lymphozyten aus der intestinalen Lamina Propria.	95
Tabelle 3.4 Auswirkungen der PCSK-Behandlung auf die mRNA-Zytokinexpression im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen.....	129
Tabelle 3.5 Auswirkungen der PCSK-Behandlung auf die Protein-Zytokinexpression im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen.....	130

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AB/AM	Antibiotische-Antimykotische (AB/AM) Lösung
ABC	" <i>ATP-binding cassette</i> "
ABCB1	" <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i> " = MDR1
Abx	Antibiotika
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCP	1-Bromo-3-Chloropropan
BSA	" <i>bovine serum albumine</i> " (Rinderserumalbumin)
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CARD15	" <i>Caspase recruitment domain 15</i> "
CCL2 = MCP-1	" <i>monocyte chemotactic protein-1</i> "
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CO ₂	Kohlendioxid
CU	Colitis Ulcerosa
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dKO	Doppel-knockout

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>"Fluorescence activated cell sorting"</i>
FCS	<i>"Fetal calf serum"</i> (Fötales Kälber Serum)
fl. N ₂	flüssiger Stickstoff
FSC	<i>"Forward scatter"</i> (Vorwärtsstreuung)
g	Gramm
GALT	<i>"Gut-associated lymphoid tissue "</i>
GWAS	<i>"Genome-wide association study"</i> (Genomweite Assoziationsstudie)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>"Horseradish peroxidase"</i> (Meerrettichperoxidase)
IECs	intestinale Epithelzellen

Abkürzungsverzeichnis

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IRAK	<i>"Interleukin-1 receptor-associated kinase"</i>
IRF-3	<i>"Interferon-regulatory factor-3"</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KO	knockout
LDH	Lactatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LP	Lamina Propria
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPMNCs	Lamina Propria Mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>"leucine rich repeats"</i>
M	Molar
MC	Morbus Crohn
MDR1A	<i>"Multidrug resistance gene 1A"</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
M-PER®	Mammalian Protein Extraction Reagent
mRNA	<i>"messenger"</i> Ribonukleinsäure
MyD88	<i>"myeloid differentiation factor"</i>
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NDS	<i>"normal donkey serum"</i> (Normales Eselserum)
NFκB	<i>"Nuclear factor κB"</i>
NGS	<i>"normal goat serum"</i> (Normales Ziegenserum)
Nlrp3 (=NALP3)	<i>"NACHT, LRR and PYD domain-containing protein 3"</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPs	<i>"Pattern associated molecular patterns"</i>
PBS	<i>"Phosphate Buffered Saline"</i>
PBST	<i>"Phosphate Buffered Saline"</i> mit Tween®20
PCR	<i>"Polymerase chain reaction"</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PCSK	Pam ₃ CysSK4 = synthetischer TLR2-Ligand

Abkürzungsverzeichnis

PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein cyanine dye 5.5
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-Glycoprotein
pH	<i>potential Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	<i>post partum</i>
PRR	<i>"Pattern recognition receptor"</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-.PCR	quantitative Reverse-Transkriptions-PCR
RAG	<i>"recombination activating gene"</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>"Reactive oxygen species"</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCID	<i>"Severe combined immunodeficiency"</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>"Standard error of the mean"</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SPF	<i>"strict pathogen-free"</i>
SSC	<i>"sideward scatter"</i> (Seitwärtsstreuung)
TAE	Tris Acetat EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TBS	<i>"Tris Buffered Saline"</i>
TBST	<i>"Tris Buffered Saline"</i> mit Tween®20
TE	Tris EDTA
TFF3	<i>"Trefoil factor 3"</i>
TIR	Toll/IL-1Rezeptor
TIRAP/Mal	<i>"TIR domain containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like"</i>
tKO	Triple-knockout
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	<i>"Trinitrobenzene Sulfuric Acid"</i>
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tollip	<i>"Toll-interacting protein"</i>
TRAF6	<i>"Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6"</i>
TRIF/TICAM	<i>"TIR-domain containing adaptor molecule"</i>
UV	Ultraviolett
vs.	versus
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung
ZTL	Zentrales Tierlabor

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Colons

Der Dickdarm besteht aus Caecum (Blinddarm), Colon und Rektum. Im Colon wird dem Darminhalt Wasser entzogen und dies sorgt so für eine Eindickung des Stuhls. Das Colon lässt sich histologisch in mehrere Schichten unterteilen, in die Mukosa, Submukosa, Muscularis und Serosa (Abb. 1.1). Von Innen ausgekleidet wird das Colon durch die Mukosa. Diese besteht aus dem Epithel, der Lamina Propria (LP) und der *Muscularis mucosae*. Das einschichtige Epithel stellt die Barriere zum Lumen dar und besteht aus Becherzellen, resorbierenden Enterozyten und enteroendokrinen Zellen (im terminalen Ileum zusätzlich Paneth-Körnerzellen). Die zahlreichen Becherzellen produzieren Mukus, der sich als schützende Schicht auf die intestinalen Epithelzellen (IECs) legt und somit den Kontakt von Bakterien und Epithel minimiert (Taupin und Podolsky 2003; Artis 2008; Cario 2010a). Zur Vergrößerung der Oberfläche ist das Mukosaepithel an zahlreichen Stellen eingestülpt und formt Krypten (Vertiefungen) und Villi (Ausstülpungen). An der Basis der Krypten sind multipotente Stammzellen lokalisiert, die sich nach Teilung in die verschiedenen Zelltypen des intestinalen Epithels differenzieren (Radtke und Clevers 2005).

Im Colon herrscht eine hohe Bakteriendichte, mit mehreren Billionen an Bakterien. Um das Eindringen von Bakterien zu verhindern, bildet das intestinale Epithel ein festes Netzwerk. Unter der Epithelschicht liegt eine lockere Bindegewebsschicht, die LP, die im gesunden Zustand eher schmal ausfällt. In dieser befinden sich einige Lymphfollikel und vereinzelte Immunzellen, die nach den Epithelzellen eine Front der Immunabwehr bilden. Zu den Immunzellen in der intestinalen LP zählen intraepitheliale Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen (Ivanov und Littman 2011; MacDonald et al. 2011).

Die LP wird begrenzt durch eine dünne Muskelschicht, die *Muscularis mucosae*, gefolgt von der Submukosa, ein dichtes Bindegewebe mit größeren Blut- und Lymphgefäßen. Umgeben wird die Submukosa von einer dickeren Muskelschicht, die

sich aus der inneren Ringmuskelschicht und der äußeren Längsmuskelschicht zusammensetzt. Die äußerste Begrenzung des Colons wird als Serosa bezeichnet.

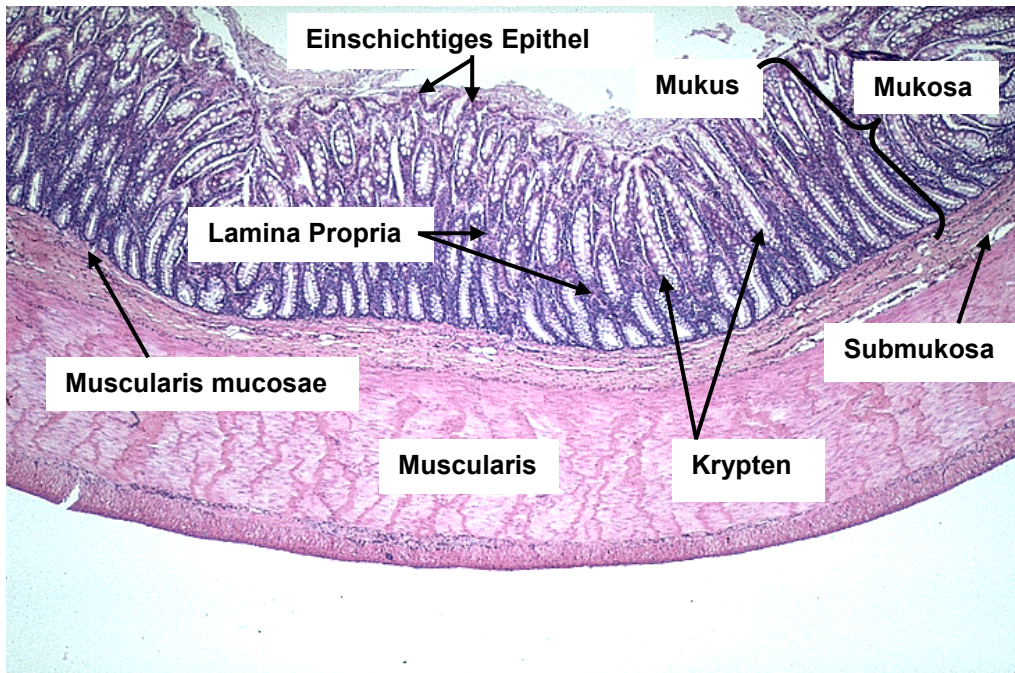


Abb. 1.1 Histologischer Aufbau des Colons im Querschnitt.

(Abbildung wurde entnommen aus <http://www.pathologyoutlines.com/colon.html> und Beschriftungen wurden eingefügt.)

1.2 Mukosales Immunsystem

Da das mukosale Immunsystem in ständigem Kontakt mit Antigenen steht, unterscheidet es sich vom systemischen Immunsystem sowohl anatomisch als auch funktionell. Es muss eine Immunantwort gegenüber Pathogenen initiieren, während es Toleranz gegenüber nicht-Pathogenen aufbauen muss.

Das mukosale Immunsystem besteht aus mononukleären Zellen der LP (LPMNCs), die diffus verteilt vorliegen und Teil des angeborenen Immunsystems sind, und Lymphozyten, die entweder über die LP verstreut sind oder in den strukturierten GALT (*“gut-associated lymphoid tissue”*) vorliegen. Während einer Infektion reagieren zunächst Zellen des angeborenen Immunsystems. In sekundären lymphoiden Organen, wie den GALT, präsentieren aktivierte antigen-präsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen) daraufhin den T-Zellen Bestandteile der aufgenommenen Antigene. Diese Interaktion führt zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Lorenz und Newberry 2004; Johansson und Kelsall 2005; Abraham

und Cho 2009). Immunzellen werden in der Abwehr zusätzlich durch das intestinale Epithel unterstützt.

1.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind die sog. “*pattern recognition receptors*” (PRRs), die der Erkennung von „Fremdbestandteilen“ (“*non-self*”) dienen (Medzhitov und Janeway 2002). Zu den PRRs gehören u.a. die Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche auf verschiedenen Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert werden, wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, CD4+-T-Zellen aber auch auf IECs (Cario 2005). TLRs erkennen unterschiedliche “*pathogen associated molecular patterns*” (PAMPs) von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, wie bakterielle Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Zymosan, Peptidoglykan (durch TLR2), doppelsträngige RNA (durch TLR3), Lipopolysaccharid (LPS) (durch TLR4 und Corezeptor MD-2), Flagellin (durch TLR5) und unmethylierte CpG DNA von Bakterien und Viren (durch TLR9) (Abb. 1.2) (Iwasaki und Medzhitov 2004; Medzhitov 2007; Kawai und Akira 2010; Kawai und Akira 2011). Das Ligandenspektrum von TLR2 wird durch die Fähigkeit vergrößert, Heterodimere mit TLR1 und TLR6 bilden zu können (Schenk et al. 2009). TLRs unterscheiden sich nicht nur in der Liganden-Spezifität, sondern auch in ihrer Lokalisierung und ihrem Expressionsmuster. So sind einige TLRs intrazellulär lokalisiert (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9), während andere extrazellulär lokalisiert sind (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6). Im gesunden Darm werden TLR2 und TLR4 nur in sehr geringem Maße exprimiert. Jedoch weisen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) eine Erhöhung der TLR2- und TLR4-Expression in IECs und/oder LPMNCs (Lamina Propria mononukleäre Zellen) auf (Cario und Podolsky 2000). Zum heutigen Zeitpunkt sind TLR2 und TLR4 die wohl am besten untersuchten TLRs.

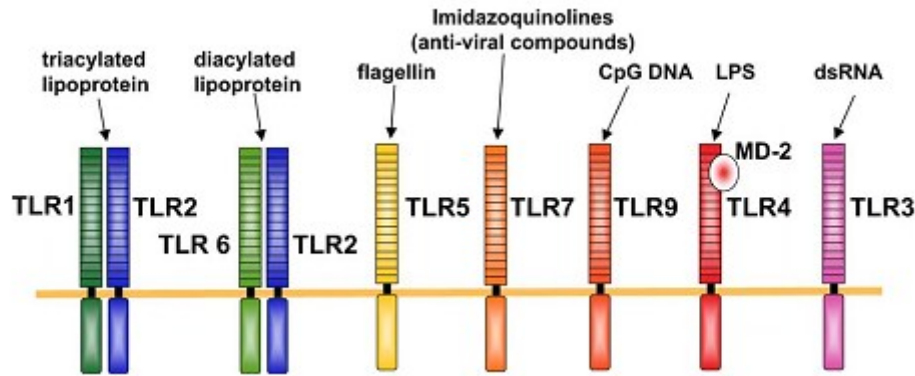


Abb. 1.2 TLRs und ihre Liganden (entnommen aus (Takeda und Akira 2004)).

TLRs erkennen unterschiedliche mikrobielle Bestandteile. TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 bzw. TLR6 und erkennt dadurch entweder triacylierte Lipoproteine oder diacylierte Lipoproteine. Virale doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von TLR3 erkannt, LPS von TLR4 und seinem Corezeptor MD-2, Flagellin von TLR5, antivirale Komponenten von TLR7 und CpG DNA von TLR9.

Die extrazelluläre Domäne von TLRs enthält Leucin-reiche Wiederholungen (*“leucine rich repeats”, LRRs*). Die intrazelluläre Domäne weist große Homologie zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) auf, und wird als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne bezeichnet. Alle TLRs (außer TLR3) und IL-1R signalisieren durch das Adapterprotein MyD88 (*“Myeloid differentiation factor 88”*), das sich an die TIR-Domäne heftet (Iwasaki und Medzhitov 2004; Medzhitov 2007; Kawai und Akira 2010; Kawai und Akira 2011). Nach Aktivierung rekrutiert MyD88 die IRAK (*“IL-1R-associated kinase”*) (Abb. 1.3). IRAK wird durch Phosphorylierung aktiviert und assoziiert daraufhin mit TRAF6 (*“tumor necrosis factor receptor-associated factor 6”*). Dies führt zur Aktivierung eines Signalweges, der schließlich zur Aktivierung von NFκB (*“nuclear factor κB”*) und Transkription proinflammatorischer Gene führt. TLR2 und TLR4 benötigen für die Signalisierung ein weiteres Adaptorprotein, das TIRAP/Mal (*“TIR domain containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like”*) (Iwasaki und Medzhitov 2004; Medzhitov 2007; Kawai und Akira 2010; Kawai und Akira 2011). Neben dem MyD88-abhängigen Signalweg existiert jedoch auch ein MyD88-unabhängiger Signalweg für TLR4 und TLR3. Dieser erfordert das Adapterprotein TRIF/TICAM-1 (*“TIR-domain containing adaptor molecule”*) und führt schließlich zur Aktivierung von NFκB und IRF-3 (*“interferon regulatory transcription factor-3”*) und zur Transkription des IFN (Interferon)-β-Gens.

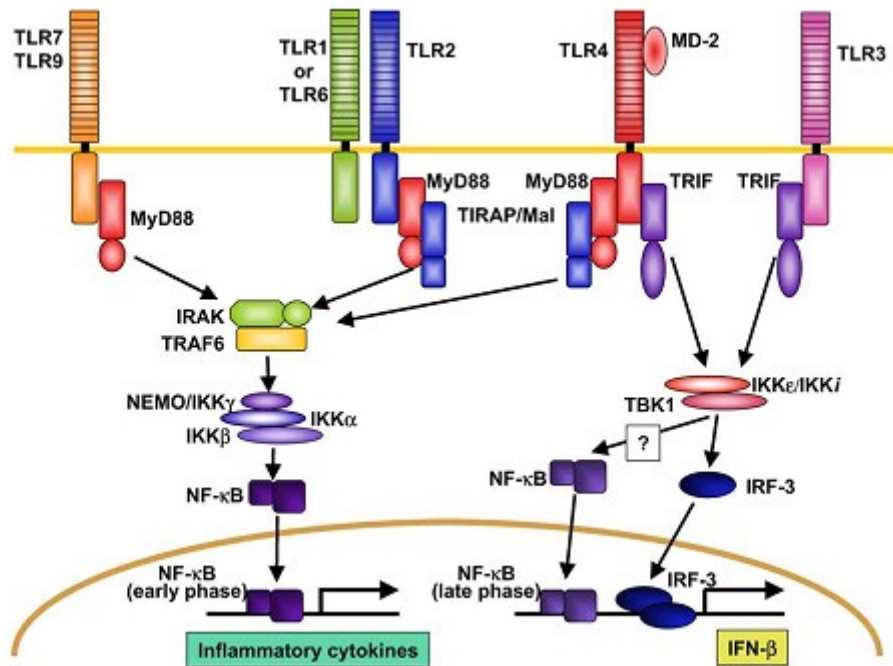


Abb. 1.3 TLR-Signalweg (entnommen aus (Takeda und Akira 2004)).

Alle TLRs, außer TLR3 signalisieren MyD88-abhängig. Nach Aktivierung der TLRs wird IRAK rekrutiert, durch Phosphorylierung aktiviert und assoziiert daraufhin mit TRAF6. Der Signalweg führt zur Aktivierung von NFκB und zur Transkription inflammatorischer Zytokin-Gene. TLR2 und TLR4 benötigen beim MyD88-abhängigen Signalweg neben MyD88 zusätzlich das TIRAP/Mal-Adapterprotein. TLR3 und TLR4 können einen MyD88-unabhängigen Signalweg über TRIF aktivieren, der schließlich zur Aktivierung von NFκB und IRF-3 und zur Transkription des IFN-β-Gens führt.

Es existieren zahlreiche Mechanismen, um eine ständige basale Stimulation des Immunsystems durch die kommensale Flora zu vermeiden (Cario und Podolsky 2005). Unter anderem zählen hierzu die geringe Expression von Oberflächenrezeptoren an der Erkennungsfront (IECs) und eine hohe Expression des Negativregulators Tollip (*"Toll-interacting protein"*), der die IRAK-Aktivierung inhibiert (Takeda und Akira 2004; Abreu 2010; Cario 2010b). IECs von CED-Patienten weisen Defekte in der Tollip-Hochregulation auf, welche zur erhöhten Entzündungsreaktion beitragen könnten (Otte et al. 2004).

Durch ihre Expression auf verschiedensten Zelltypen, stellen TLRs ein Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort dar (Abreu 2010; Cario 2010b).

1.2.2 Intestinales Epithel

Becherzellen sorgen für die erste mechanische Barriere gegenüber intestinalen Bakterien, indem sie Mukus sezernieren, der sich schützend über das Epithel legt. Der produzierte Schleim enthält eine Reihe an bioaktiven Molekülen, u.a. sekretierte und membrangebundene Glycoproteine (sog. Mucine) und intestinales TFF3 (*“trefoil factor 3”*) (Taupin und Podolsky 2003; Artis 2008; Cario 2010a). Trefoil Peptide dienen sowohl der Abwehr als auch der mukosalen Regeneration (Taupin und Podolsky 2003).

Da dennoch ein ständiger Kontakt zwischen intestinalem Epithel und Bakterien besteht, sind streng regulierte Toleranzmechanismen wichtig, die unter normalen Bedingungen proinflammatorische Antworten auf die kommensale Mikroflora verhindern, während pathogene Keime vom Immunsystem erkannt und durch eine entsprechende Immunreaktion bekämpft werden müssen.

Die intestinale epitheliale Barriere weist eine selektive Permeabilität auf. Während die Aufnahme von Nährstoffen und der Austausch von Molekülen zur Kommunikation zwischen Epithelzellen ermöglicht werden, wird das Eindringen von Pathogenen und größeren Molekülen von außen verhindert. IECs sind durch Proteinkomplexe, den *“tight junctions”*, *“adherens junctions”* und Desmosomen, miteinander verbunden und bilden so eine feste Barriere (Turner 2009; Cario 2010b). Kommunikation zwischen Epithelzellen kann mittels *“gap junctions”* erfolgen. Die Zell-Zell-Kontakte unterliegen einer strengen Regulation und können durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Die Aktivierung von TLR2 auf IECs schützt die *“tight junction”*-assoziierte Barriereintegrität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Cario et al. 2004; Cario et al. 2007).

Neben der Funktion der Barriere und Absorption sind Epithelzellen auch an der Immunabwehr beteiligt. IECs sind in der Lage Bakterien durch die Expression von PRRs zu erkennen und daraufhin Zytokine und Chemokine zu produzieren. Diese führen dann zur Rekrutierung von Immunzellen (Iwasaki und Medzhitov 2004; Kawai und Akira 2010; Ivanov und Littman 2011; MacDonald et al. 2011), die wiederum eine entsprechende Immunantwort auslösen können.

1.2.3 Pumpen/ABC-Transporter

Ein weiterer Schutzmechanismus der Mukosa ist die Expression des ABCB1/MDR1 (*"multidrug resistance"*) Gens. Das ABCB1/MDR1-Gen codiert für das 170 kDa große, zellassozierte P-Glycoprotein (P-gp), einen ABC (*"ATP-binding cassette"*)-Transporter, der xenobiotische Substanzen aus der Zelle ausschleust. P-gp war der erste ABC-Transporter, der im Zusammenhang mit erhöhter Resistenz von Tumorzellen gegenüber multiplen Chemotherapeutika assoziiert und charakterisiert wurde (Dean et al. 2001; Mercado-Lubo und McCormick 2010). Die Pumpe senkt die Ansammlung von toxischen Produkten innerhalb der Zelle und wird von mehreren Zelltypen in verschiedenen Geweben exprimiert, v.a. dort, wo eine Barrierefunktion essentiell ist, wie der Blut-Hirn-Schranke (Cordon-Cardo et al. 1989), Plazenta (Sugawara et al. 1988) und Darm (Thiebaut et al. 1987). Im Colon wird P-gp auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, u.a. auf intraepithelialen Lymphozyten, hämatopoetischen Zellen und auf der apikalen Seite der IECs (Ho et al. 2003; Annese et al. 2006; Collett et al. 2008; Mercado-Lubo und McCormick 2010). Das distale Colon ist ein Bereich mit relativ hoher transzellulärer Permeabilität für Xenobiotika. Dies wird anscheinend durch eine höhere Expression von P-gp kompensiert (Stephens et al. 2002). Die Expression von ABCB1/MDR1A trägt somit zur Barriereintegrität im Colon bei und verhindert die Invasion pathogener Bakterien. So konnte gezeigt werden, dass die Invasion von *Listeria monocytogenes* durch die Expression von P-gp verhindert wird (Neudeck et al. 2004). Patienten mit CED weisen z.T. eine stark reduzierte Expression von P-gp auf und die dadurch verringerte Barrierefunktion könnte die bestehende Entzündung weiter verschlimmern (Blokzijl et al. 2007; Mercado-Lubo und McCormick 2010). Außerdem liegt das humane ABCB1/MDR1-Gen in einer Region auf Chromosom 7, die mit erhöhter Suszeptibilität für CED assoziiert wurde (Satsangi et al. 1996). Variationen des humanen ABCB1/MDR1-Gens prädisponieren zu Colitis Ulcerosa (CU) (Schwab et al. 2003; Potocnik et al. 2004; Ho et al. 2005; Ho et al. 2006) und CED-Patienten weisen eine erniedrigte ABCB1/MDR1-mRNA-Genexpression im entzündeten Colon auf (Langmann et al. 2004; Blokzijl et al. 2007).

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.3.1 Allgemeine Kennzeichen der CED

Der Begriff der CED umfasst den Morbus Crohn (MC) und die Colitis Ulcerosa (CU), beide gekennzeichnet durch chronische Entzündung des Darms, mit abwechselnden Phasen der akuten Schübe und Erholung. Die Zahl der Betroffenen schwankt stark zwischen unterschiedlichen Regionen der Welt. Die höchste Prävalenz für CED ist in Nordamerika und Europa zu finden (Ott et al. 2008), mit 100-200 Fällen pro 100.000 Einwohner (Ince et al. 2008). In Deutschland beträgt die Inzidenz für MC 5 Fälle pro 100.000 und für CU 3,5 Fälle pro 100.000 Einwohner im Jahr (Ott et al. 2008). Der Krankheitsbeginn ist oft zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr (Xavier und Podolsky 2007; Abraham und Cho 2009). Während einer CED weist die intestinale LP eine erhöhte Anzahl an rekrutierten Immunzellen und erhöhte Zytokinproduktion auf. Des Weiteren sind Defekte der intestinalen epithelialen Barriere nachweisbar. Es wird davon ausgegangen, dass CED in einem genetisch anfälligen Individuum durch eine unangemessene und anhaltende Immunantwort gegenüber der kommensalen Mikroflora zustande kommt und durch Umweltfaktoren getriggert wird (Abb. 1.4) (Khor et al. 2011).

Die vererbte Komponente ist bei MC stärker als bei CU (Xavier und Podolsky 2007). Die Entzündung bei MC kann alle Teile des Intestinaltraktes betreffen und verläuft nicht durchgehend, sondern fleckig. Am häufigsten ist das terminale Ileum betroffen. Histologisch sind Aggregate an Makrophagen in der intestinalen LP zu erkennen, die sog. Granulome bilden. Die Mukosa ist z.T. stark verdickt und inflammatorische Infiltrationen sind transmural in allen Schichten zu finden (Xavier und Podolsky 2007; Khor et al. 2011). Bei CU ist die Entzündung diffus, breitet sich kontinuierlich vom Rektum nach proximal aus und betrifft nur das Colon (Khor et al. 2011). Histologisch sind oberflächliche Ulcerationen zu erkennen und Neutrophile formen kleine Abszesse in der LP und in den Krypten (sog. Kryptenabszesse). Die oberflächlichen inflammatorischen Infiltrate sind im Gegensatz zu MC lediglich in der Mukosa und Submukosa zu finden. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust an schleimproduzierenden Becherzellen (Xavier und Podolsky 2007).

1.3.2 CED-beeinflussende Faktoren

CED sind multifaktorielle Erkrankungen, die sowohl durch die Umwelt, Gene und Bakterien beeinflusst werden (Xavier und Podolsky 2007; Abraham und Cho 2009; Cario 2010b; Saleh und Elson 2011; Strober und Fuss 2011). Umweltfaktoren, wie die Einnahme von antiinflammatorischen Medikamenten, Stress und Rauchen, scheinen den Verlauf von CED zu modifizieren (Holtmann et al. 2002; Podolsky 2002). Rauchen ist bei CU eher protektiv, während sich MC durch Zigarettenkonsum verschlimmert. Einen Beitrag der genetischen Komponente bei CED wurde durch Zwillingsstudien gezeigt (Abraham und Cho 2009) und wird durch verschiedene Studien an murinen Modellen unterstützt. Des Weiteren wurden in den letzten Jahren im Rahmen der GWAS (*“genome-wide association studies”*) 99 Suszeptibilitäts-Loci für CED identifiziert, wovon sich MC und CU etwa 30% dieser Loci teilen (Khor et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass diese zwei Erkrankungen teils gemeinsamen Signalwegen unterliegen. Suszeptibilitäts-Gene betreffen v.a. die Barrierefunktion, epitheliale Wundheilung, mikrobielle Abwehr, Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort, Generierung von ROS (*“reactive oxygen species”*), Autophagie, ER (endoplasmatisches Retikulum)-Stress und metabolische Aktivität (Khor et al. 2011). Es gibt sicher noch mehr Suszeptibilitäts-Gene, jedoch berücksichtigen GWAS nur Variationen, die mit einer Frequenz von >1% vorkommen. Seltene Variationen tauchen bei GWAS nicht auf.

Zu den prädisponierenden Genen für MC zählen u.a. Mutationen im NOD2/CARD15 (*“Caspase activation and recruitment domain”*)-Gen, das für einen PRR codiert, und Mutationen im Autophagie-Gen ATG16L (Xavier und Podolsky 2007; Khor et al. 2011). Im Gegensatz dazu sind Mutationen im Gen für Interferon- γ (IFN- γ) mit CU assoziiert (Abraham und Cho 2009). Genmutationen in Interleukin-23 (IL-23)-Rezeptor und IL-12 führen zu erhöhter Suszeptibilität sowohl für MC als auch für CU.

Die kommensale Mikroflora des Darms löst unter normalen Umständen keine Entzündungsreaktion aus. Kommt es jedoch zu einer Dysregulation in der Interaktion zwischen Mikroflora und Mukosabarriere, kann das eine intestinale Entzündung zur Folge haben (Sartor 2008a; Strober und Fuss 2011). Die Rolle von Bakterien in CED wird dadurch deutlich, dass CED-Patienten eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora (sog. Dysbiose) aufweisen und Antibiotika in einem Teil der CED-Patienten wirksam sein können. CED jedoch mit einer bestimmten bakteriellen

Komposition des Colons zu assoziieren ist schwer möglich, da die interindividuelle Vielfalt sehr groß ist (Sartor 2008a).

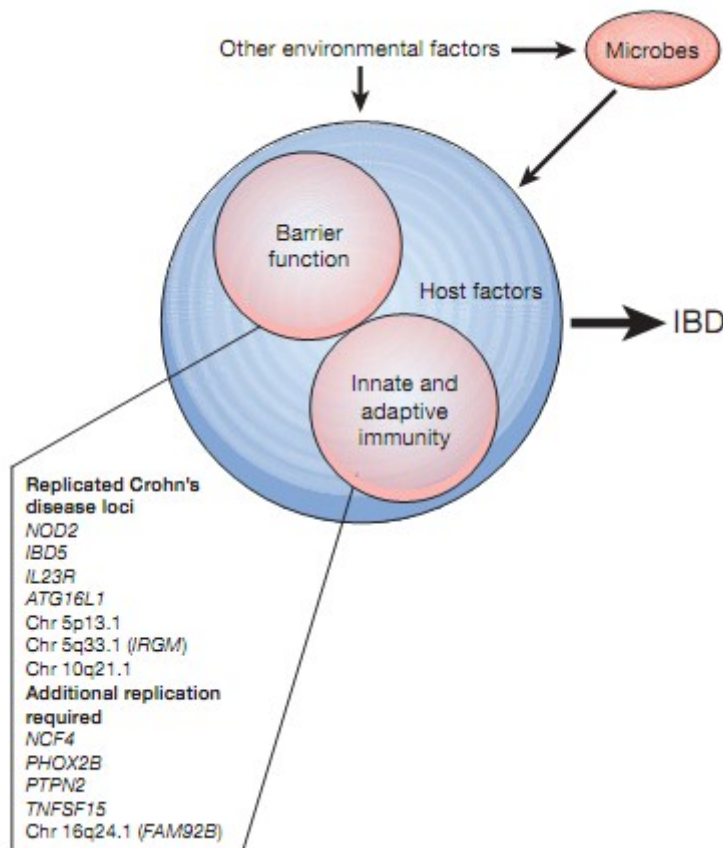


Abb. 1.4 CED-Ätiopathogenese (entnommen aus (Xavier und Podolsky 2007)).

CED ("IBD", "inflammatory bowel disease") sind multifaktorielle Erkrankungen, bei denen sowohl Barrierefunktion ("Barrier function"), angeborene und erworbene Immunität ("Innate and adaptive immunity") des Individuums ("host"), als auch die intestinale Mikroflora ("microbes") und andere Umweltfaktoren ("other environmental factors") eine Rolle spielen. Es wird davon ausgegangen, dass es in einem genetisch prädisponierten Individuum zu Defekten der intestinalen Barriere und zu einer gestörten Interaktion der Mikroflora mit dem Immunsystem kommt, welches dann eine Entzündung des Darms auslöst.

1.3.3 Therapiemöglichkeiten

Bis jetzt ist die Ätiopathogenese von CED noch nicht ausreichend geklärt und wird durch zu viele Faktoren beeinflusst. Demnach ist eine Heilung bis heute nicht möglich. Es gibt jedoch unterschiedliche Ansätze zur Therapie von CED, u.a. kann es sinnvoll sein, den Lebensstil der Patienten zu verändern. In extremen Fällen kann auch ein chirurgischer Einsatz helfen. Die medikamentöse Therapie besteht aus einer Behandlung mit antiinflammatorischen, immunsupprimierenden und

immunmodulierenden Medikamenten (Blonski et al. 2011; Plevy und Targan 2011). Die weitere Forschung an CED könnte möglicherweise zukünftig zu einer individuell angepassten Therapie führen, die den Phäno-/Genotyp der Patienten berücksichtigt und gezielt angreift.

1.4 Murine Colitismodelle

Es gibt zahlreiche murine Modelle zur Untersuchung von CED, die sich untereinander z.T. jedoch stark unterscheiden. So gibt es chronische Spontancolitismodelle in genetisch modifizierten Mäusen, Spontancolitis in experimentellen/rekonstituierten Mäusen und experimentell-induzierte intestinale Entzündung. Chemisch kann eine Entzündung des Darms durch orale Gabe von DSS (Dextran-Natrium-Sulfat) und durch rektale Verabreichung von TNBS (*Trinitrobenzene Sulfuric Acid*) oder Oxazolone ausgelöst werden (Wirtz et al. 2007). Die dadurch entstehende sekundäre Entzündung ähnelt in einigen Aspekten der intestinalen Inflammation während CU und MC. Durch den Transfer von CD45RB^{hi} T-Zellen in SCID (*severe combined immunodeficiency*)- oder RAG (*recombination activation gene*)-defiziente Mäuse kann eine chronische Colitis ausgelöst werden (Powrie et al. 1994). Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung von CED ist die Generierung von genetisch veränderten Mäusen, die eine Spontancolitis entwickeln (Mizoguchi und Mizoguchi 2010). Beispiele hierfür sind u.a. IL-10 *knockout* (KO)- (Kuhn et al. 1993), Mucin2 KO- (Van der Sluis et al. 2006), IL-7-transgene (Watanabe et al. 1998) und MDR1A KO- (Panwala et al. 1998) Mäuse.

Murine Spontancolitismodelle sind im Allgemeinen kommensal-abhängig, wie durch zahlreiche Antibiotikaversuche und Haltung in keimfreien Bedingungen nachgewiesen werden konnte. So entwickeln IL-2 KO- (Contractor et al. 1998), IL-10 KO- (Sellon et al. 1998) und MDR1A KO- (Wilk et al. 2005) Mäuse unter keimfreien Bedingungen keinerlei Anzeichen einer Colitis, während sie unter konventionellen Bedingungen eine Colitis entwickeln können. In IL-10 KO-Mäusen kann die Infektion mit einem einzigen Bakterium, *Bacteroides vulgatus*, zur Colitisentwicklung führen (Sellon et al. 1998).

Es gibt erste Hinweise, dass Bakterien die Colitis bei MDR1A KO-Mäusen triggern (Panwala et al. 1998; Wilk et al. 2005), aber die Rolle, die das angeborene Immunsystem dabei spielt, ist bis jetzt unklar. Die Tatsache, dass MDR1A-defiziente

Mäuse eine CU-ähnliche Spontancolitis entwickeln und CU-prädisponierende genetische Variationen im humanen ABCB1/MDR1A Gen identifiziert wurden, macht MDR1A-KO-Mäuse zu einem adäquaten Modell, um die pathogenetischen Mechanismen bei CU näher zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Variationen des ABCB1/MDR1A-Gens wurden mit erhöhter Suszeptibilität für CU assoziiert und MDR1A-defiziente Mäuse entwickeln eine chronische Spontancolitis, die im Phänotyp der humanen CU ähnelt. Bis jetzt sind die Mechanismen der angeborenen Immunantwort bei MDR1A-defizienter Colitis jedoch noch nicht geklärt. Ziel dieser Studie war es, die Beteiligung des angeborenen Immunsystems in der Colitisentwicklung bei MDR1A-defizienten Mäusen zu untersuchen. Initiale Ergebnisse zeigten eine selektive Erhöhung von TLR2-mRNA im entzündeten Colon von MDR1A KO-Mäusen. Um die funktionelle Rolle von TLR2 in der Colitispathogenese zu charakterisieren, wurden Doppel-knockout Mäuse (dKO) generiert, die defizient für MDR1A und TLR2 waren. MyD88 ist ein gemeinsames Signal-Adapterprotein der meisten TLRs und IL-1R. Um die Funktion von MyD88 in der Colitispathogenese zu untersuchen, wurden zusätzlich MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A Triple-knockout (tKO)-Mäuse generiert. Klinische und histopathologische Parameter der Colitisentwicklung sollten analysiert und inflammatorische Infiltrate in der LP anhand von Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert werden. Die Art der T-Zell-Immunantwort sollte auf mRNA-Ebene definiert und verschiedene proinflammatorische Mediatoren mit Proteinarrays nachgewiesen werden. Mit *in vitro* Versuchen sollte die basale Produktion von inflammatorischen Faktoren durch T-Zellen und die IL-1 β -Produktion durch LPS-stimulierte Makrophagen in Abwesenheit von TLR2 und MDR1A analysiert werden. Schließlich sollten verschiedene Behandlungsansätze getestet werden, wie 1. die *prophylaktische* und *therapeutische* Antibiose und 2. die systemische Blockade des IL-1 β -Signalweges bei TLR2/MDR1A dKO-Colitis sowie 3. die Aktivierung des TLR2-Signalweges durch orale Gabe eines spezifischen TLR2-Liganden bei MDR1A KO-Colitis.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

2.1.1 Materialien

3-Wege-Hahn, blau*	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
10ml Spritze*	Terumo, Belgien
Blotting Schwämme	Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläser 24 x 36mm	Engelbrecht Medizin- und Labor- Technik GmbH, Edermünde
Deckgläser, geschliffen (kontrollierte Dicke 0,17 ± 0,01mm; 50 x 24mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co Kg, Sondheim
Einmalskalpell*	servoprax® GmbH, Wesel
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5ml & 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen 5ml, 12 x 75mm *	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon tubes (15ml & 50ml)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen*	
0,1 – 10µl	
1 – 100µl	
101 – 1000µl	StarLab, Ahrensburg
Gelkammer Horizon® 58	Life Technologies, Darmstadt

Glaswolle	freundlicherweise von Dr. Emiko Mizoguchi, Mass. Gen. Hosp. Boston, USA bereitgestellt
Heat Sealing-Film	Eppendorf, Hamburg
Kryogefäß (2ml)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Küvetten, UVette® 220-1600nm*	Eppendorf, Hamburg
Micro Tube 1,3ml K3E, EDTA	Sarstedt, Mümbrecht
Nadel 27G x ¾" Nr. 20*	BD Biosciences, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
NuPAGE 4-12% Bis-Tris SDS Page Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger 76 x 26 mm / 3 x 1 inch	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger Superfrost® Plus Gold	Thermo Scientific, Schwerte
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR Reaktionsgefäße (0,5ml)	Roth, Karlsruhe
Petrischale*	BD Falcon, Heidelberg
Poly-D-Lysine Cellware, 8-well CultureSlide*	BD BioCoat™, Belgien
PVDF-Membran Immobilon-P	
Porengröße 0,45µm	Millipore, Eschborn
Rasierklinge	Apollo, Solingen
Realtime Filterspitzen*	
0,1 – 10µl	
2 – 100µl	
50 – 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm-Kassette	Rego, Augsburg

Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Saranfolie	Dow, Schwalbach/Ts.
TissueRuptor Disposable Probes (25)	Qiagen, Hilden
Twin.tec real-time PCR Platten 96	Eppendorf, Hamburg
Vakuum Filtrationssystem, 500ml *	TPP, Schweiz
Whatman Papier; Dicke 3MM CHR	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturpipetten*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkultur-Platten (6, 12 and 96 wells)*	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellsieb, 40µm, blau*	BD Biosciences, Heidelberg
Zellsieb, 100µm, gelb*	BD Biosciences, Heidelberg

Materialien, die mit einem * versehen sind, sind steril

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

10x PCR Puffer (ohne $MgCl_2$)	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
10xRPMI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Bromo-3-chloropropan (BCP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
50mM $MgCl_2$	Invitrogen, Karlsruhe
6x Orange Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Aceton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose (Ultrarein)	Invitrogen, Karlsruhe

Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
Antibiotische-Antimykotische (AB/AM) Lösung	
(enthält: Penicillin, Streptomycin-Sulphat, Amphotericin B)	PAA, Österreich
Aqua dest.	Braun Melsungen AG, Melsungen
Bio Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München
BSA (Pulver)	PAA, Österreich
Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free	
Hanks'-based	Gibco, Karlsruhe
CitraMount™ Eindeck-Medium	Polysciences Inc., USA
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	
Tabletten	Roche, Mannheim
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, Heidelberg
dNTP Mix 10mM	Invitrogen, Karlsruhe
DPBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Gibco, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Reagenzien	Perkin Elmer, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eindeck-Medium mit DAPI	Vectashield Vektor, Lörrach
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol analytical grade	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid-Lösung 0,025%	Roth, Karlsruhe

Fötale Kälber Serum (FCS), Endotoxin-frei

Lot # A10207-0103

Lot # A10208-1581

PAA, Österreich

Fc-Block, mouse BD Fc-Block™

BD Biosciences, Heidelberg

Hank's BSS (HBSS)

PAA, Österreich

HCl

Roth, Karlsruhe

HEPES Puffer (1M)

PAA, Österreich

ImmEdge Pen

Vector Laboratories, USA

Isoflurane Forene 100%

Abbott, Wiesbaden

Kineret® 100mg, Anakinra

Biovitrum, Schweden

Kompensationsbeads, BD™ Comp Beads

BD Biosciences, Heidelberg

Leibovitz-L15

PAA, Österreich

L-Glutamin

PAA, Österreich

Lipopolysaccharid von *E.coli*, ultrarein

Serotype R515 (Re) (flüssig)

ALEXIS, Schweiz

LIVE/DEAD® Fixable Near IR Stain, APC

Invitrogen, Karlsruhe

Macrophage Medium

PAA, Österreich

Magermilchpulver

AppliChem, Darmstadt

β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Methanol

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

M-PER® Mammalian Protein

Extraction Reagent

Thermo Scientific, Schwerte

Na₃VO₄

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

NaCl	Gerbu Biochemie GmbH, Gaiberg
Nagellack	diverse
Normales Eselserum (NDS)	Jackson Immuno Research, United Kingdom
Normales Ziegenserum (NGS)	Vector Laboratories, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer (20X)	Invitrogen, Karlsruhe
Öl für Immunfluoreszenz	
Immersol™ 518F	Zeiss, Jena
Paraformaldehyd (16%)	Electron Microscopy Sciences, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S) (100x)	PAA, Österreich
Percoll™	GE Healthcare, Schweden
PCSK (Pam ₃ CysSK4, Lot#L08/02 und #A10/02)	EMC Microcollections GmbH, Tübingen
Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	
Tabletten	Roche, Mannheim
PMSF Plus	Roche, Mannheim
RNA-later	Ambion, Darmstadt
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase Zap	Ambion, Darmstadt
Röntgenentwickler-Konzentrat (5x)	Adefo Chemie, Dietzenbach

Röntgenfixier-Konzentrat (5x)	Adefo Chemie, Dietzenbach
RPMI	PAA, Österreich
SDS-Lösung (10%)	Ambion, Darmstadt
SPOTCHEM™ Leberprofil Multistreifen	Arkray, Niederlande
TAE-Puffer 50x (Tris Acetat EDTA Puffer)	Qiagen, Hilden
TE-Puffer pH 7,0 (steril)	Ambion, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Niederlande
TRI-Reagenz	Ambion, Darmstadt
Tris	MP Biomedicals, USA
Triton X-100 (10%)	Thermo Scientific, Schwerte
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vancomycin-ratiopharm ® 0,5g	Ratiopharm GmbH, Ulm
Xylenersatz	Thermo Scientific, Schwerte
Zienam ® 500mg	MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Promega, Mannheim
Collagenase Typ II	Gibco, Karlsruhe
Dispase	Gibco, Karlsruhe
DNaseI	Roche, Mannheim
HotStar Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Freies DNase Set	Qiagen, Hilden

2.1.4 Ladder & Marker

Express DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
MagicMark™ XP	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue® Plus2 Pre-stained	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Geräte

Autoklav 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Bakterienschüttler KS125 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Durchflusszytometer BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationssystem	Biostep, Jahnsdorf
Heizblock SLTDB-120	Biosan, Litauen
Kamera Nikon Digital Sight DS-U1	Nikon, Düsseldorf
Kryostat, Kryotom HM560	Microm, Walldorf
Kühlblock SC-2	Biosan, Litauen

Mikroskope

Laser Scanning Mikroskop Axiovert

100 LSM 510	Zeiss, Jena
-------------	-------------

Nikon Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
--------------------	-------------------

pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	
0,1 – 2.5µl	
0,5 – 10µl	
10 – 100µl	
100 – 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Powersupply Power Pac300	Bio-Rad, München
Realtime PCR-Maschine	
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Rollschüttler Stuart SRT 9	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Scanner EPSON Perfection V750 PRO	Epson, Meerbusch
SPOTCHEM™ EZ SP-4430	Arkray, Niederlande
Thermocycler GeneAmp PCR	
System 9600	Perkin Elmer, USA
Tischzentrifugen	
Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tisch-Kühlzentrifuge Hermle Z233 MK-2	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tissue-Ruptor	Qiagen, Hilden
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen

Waagen

Fine Scale Delta Range AT261	Mettler, Giessen
Kern 440-210N	Kern, Balingen-Frommern
MP-3000 Chyo	Göntgen Wägetechnik, Bottrop
Navigator™	Ohaus, Schweiz

Wasserbad

Julabo, Seelbach

XCell II Blot Module

Invitrogen, Karlsruhe

XCell *SureLock* Mini-Cell

Invitrogen, Karlsruhe

Zellkulturinkubator mit CO₂, MCO-5M

Sanyo, Japan

Zellkulturinkubator ohne CO₂

Binder GmbH, Tuttlingen

Zellkulturzentrifuge 5810R

Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Lösungen und Puffer

Dispase-Lösung

90ml LPL-Medium
180mg Dispase
➔ Sterilfiltration

Dispase/Collagenase-Lösung

100ml LPL-Medium
100mg Dispase
150mg Collagenase
➔ Sterilfiltration

DTT

1M in Aqua dest.

FACS Puffer

DPBS (ohne Ca²⁺ & Mg²⁺)
2% FCS

LPL-Medium	RPMI 4% FCS 2,5% HEPES 1% AB/AM 1% Glutamin
Kulturmedium	Leibovitz L-15 10% FCS 1% P/S
Makrophagen-Medium	Macrophage Medium 1% P/S
Milch-Blockpuffer	5% Magermilchpulver in TBST oder PBST
MOPS-Laufpuffer (1x)	1/20 Verdünnung von NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (20x) mit Aqua dest.
PBST	1 Packung Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, Pulver 1000ml Aqua dest. 0,05% Tween® 20
Protein Lysispuffer	10ml M-PER® 1 Tablette PhosSTOP 1 Tablette Complete Mini
"Stripping"-Puffer	10ml 10% SDS-Lösung 3,125ml Tris-HCl pH 6,8 300µl β-Mercaptoethanol 36,5ml Aqua dest.

TAE-Buffer (1x)	1/50 Verdünnung von TAE-Puffer (50x) mit Aqua dest.
TBST	TBS 0,05% Tween® 20
Transferpuffer (1x)	1/20 Verdünnung von NuPAGE® Transferpuffer (20X) mit Aqua dest. 10% Methanol
Tris Buffered Saline (TBS)	10mM Tris 150mM NaCl in Aqua dest. pH 7,6
Röntgenentwickler-Lösung	1/5 Verdünnung von Röntgenentwickler-Konzentrat (5x) mit Aqua dest.
Röntgenfixierer-Lösung	1/5 Verdünnung von Röntgenfixier-Konzentrat (5x) mit Aqua dest.

2.1.7 Kits

DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EasySep® Mouse T Cell Enrichment Kit	Stem Cell Technologies, Frankreich
Fast Frozen Stain Kit	Polysciences, USA
One Step QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array 3	RayBiotech, USA

RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array 6	RayBiotech, USA
RiboPure™ Kit	Ambion, Darmstadt
RNase-Freies DNase-Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8 Primer

Tabelle 2.1 Primer zur Genotypisierung

Gen	Primernamen	Sequenz	Firma
MDR1A	MDR1AS2	5' – CTC CTC CAA GGT GCA TAG ACC – 3'	Eurofins MWG
MDR1A	MDR1AW2	5' – CCC AGC TCT TCA TCT AAC TAC CCT G – 3'	Operon,
MDR1A	MDR1AKO2	5' – CTT CCC AGC CTC TGA GCC CAG – 3'	Deutschland
TLR2	IMR3041	5' – CTT CCT GAA TTT GTC CAG TAC A – 3'	Eurogentec
TLR2	IMR3043	5' – GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC – 3'	S.A., Belgien
TLR2	IMR3091	5' – ACG AGC AAG ATC AAC AGG AGA – 3'	
MyD88	P1	5' – AGA CAG GCT GAG TGC AAA CTT GTG CTG – 3'	Eurogentec
MyD88	P2	5' – AGC CTC TAC ACC CTT CTC TTC TCC ACA – 3'	S.A., Belgien
MyD88	P3	5' – ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG -3'	

Tabelle 2.2 Primer zur Realtime qRT-PCR

Gen	Assayname	Firma und Katalognummer
Ccl2	Mm_Ccl2_1_SG	Qiagen, QT00167832
Cd3e	Mm_Cd3e_2_SG	Qiagen, QT01758407
Defa1	Mm_Defcr1_1_SG	Qiagen, QT00198716
Defa5	Mm_Defa5_1_SG	Qiagen, QT00280315
Gapdh	Mm_Gapdh3_SG	Qiagen, QT01658692
Il1b	Mm_Il1b_2_SG	Qiagen, QT01048355
Il2	Mm_Il2_1_SG	Qiagen, QT00112315
Il4	Mm_Il4_1_SG	Qiagen, QT00160678
Il10	Mm_Il10_1_SG	Qiagen, QT00106169
Il12b	Mm_Il12b_1_SG	Qiagen, QT00153643
Il21	Mm_Il21_2_SG	Qiagen, QT01758036
Il17f	Mm_Il17f_1_SG	Qiagen, QT00144347
Il23r	Mm_Il23r_1_SG	Qiagen, QT00138719
Il27	Mm_Il27_1_SG	Qiagen, QT00143017
Infg	Mm_Ifng_1_SG	Qiagen, QT01038821
Lyz1	Mm_Lyz1_1_SG	Qiagen, QT00143269
Lyz2	Mm_Lyz2_1_SG	Qiagen, QT01555701
Pla2g2e	Mm_Pla2g2e_1_SG	Qiagen, QT01049125
Reg3g	Mm_Reg3g_1_SG	Qiagen, QT00147455
Tlr1	Mm_Tlr1_1_SG	Qiagen, QT00157430
Tlr2	Mm_Tlr2_1_SG	Qiagen, QT00129752
Tlr4	Mm_Tlr4_1_SG	Qiagen, QT00259042

Tlr5	Mm_Tlr5_1_SG	Qiagen, QT00262549
Tlr6	Mm_Tlr6_1_SG	Qiagen, QT01078658
Tlr9	Mm_Tlr9_3_SG	Qiagen, QT01748901
Tnf	Mm_Tnf_1_SG	Qiagen, QT00104006

2.1.9 Antikörper

Tabelle 2.3 Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper-Spezifität	Fixierung	Wirt	Verdünnung	Firma
CD4	5 min Aceton, -20°C	Ratte	1/50	BDPharmingen
CD8	5 min Aceton, -20°C	Ratte	1/30	BDPharmingen
CD11b	5 min Aceton, -20°C	Ratte	1/50	BDPharmingen
CD45	5 min Aceton/MeOH, -20°C	Ratte	1/50	Santa Cruz
Cx43 (CX-1B1)	1 min Aceton, -20°C	Maus	1/50	Zymed
Cx43 (Z-JB1)	1 min Aceton, -20°C	Kaninchen	1/50	Zymed
p-Cx43	1 min Aceton, -20°C	Kaninchen	1/50	Cell Signaling
F4/80	10 min Aceton, RT	Ratte	1/50	Serotec
Gr-1	5 min Aceton/MeOH, -20°C	Ratte	1/40	BDPharmingen
IL1β	5 min Aceton/MeOH, -20°C	Ziege	1/100	R&D Systems
Pan-Zytokeratin	1 min Aceton, -20°C	Kaninchen	1/25	Santa Cruz
ZO-1	5 min Aceton, -20°C	Kaninchen	1/50	Zymed
Ratten IgG				Santa Cruz
Ziegen IgG				Santa Cruz
Kaninchen IgG				Santa Cruz

Tabelle 2.4 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Verdünnung	Firma
Esel anti-Ziege FITC	1/50	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor488®	1/100	Invitrogen
Ziege anti-Kaninchen Cy5	1/100	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Ziege anti-Ratte Alexa Fluor488®	1/100	Invitrogen

Tabelle 2.5 Primäre Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Antikörper-Spezifität	Wirt	Verdünnung		Firma
Cx43(CX-1B1)	Maus	1/500	5% Milch/TBST	Zymed
Cx43(Z-JB1)	Kaninchen	1/500	5% Milch/TBST	Zymed
p-Cx43	Kaninchen	1/250	5% BSA/TBST	Cell Signaling
pro-IL1β	Ziege	1/500	5%Milch/PBST	R&D Systems
cleaved IL1β	Kaninchen	1/400	5%Milch/PBST	Abcam
GAPDH	Maus	1/2000	5%Milch/TBST	Sigma-Aldrich
Nlrp3	Maus	1/500	5% Milch/PBST	Alexis
ZO-1	Kaninchen	1/500	5% Milch/TBST	Zymed

Tabelle 2.6 Sekundäre Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Antikörper	Verdünnung	Firma
ECL™ (Schaf) Anti-Maus IgG HRP-gekoppelt	1/6250	GE Healthcare, United Kingdom
ECL™ (Esel) Anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt	1/6250	GE Healthcare, United Kingdom
Peroxidase-gekoppelter (Kaninchen) Anti-Ziege IgG	1/6250	ICN/Cappel, USA

Tabelle 2.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper-Spezifität	Wirt	Konjugation	Verdünnung	Firma
CD11b	Ratte	PerCP-Cy5.5	1/400	BD Pharmingen
IL-1 β	Ratte	APC	1/50	eBioscience

2.1.10 Software

Adobe Photoshop CS4 Version 11.01 Software

BD FACS Diva software

Flowjo 7.5.5

GraphPad Prism, version 4.03, GraphPad software

Mastercycler® ep realplex software

NIS-Elements BR 3.0 software

Phoretix™ grabber software

RayBio® Murine Cytokine 3.1 Analysis Tool

Zeiss LSM 510 v.3.2 software

2.2 Methoden

2.2.1 Mäuse und Tierhaltung

Wildtyp (WT) FVB/N-Mäuse und MDR1A knockout (KO)-Mäuse [FVB.129P2-Abcb1atm1Bor; >F7] wurden von Taconic Farms (Germantown, NY) unter “*Research Cross-Breeding Agreement*” erworben. TLR2 KO-Mäuse (Tlr2tm1Kir; >F10) und deren WT-Kontrollen [C57BL6/J] stammten von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

MyD88-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Shizuo Akira (Department of Host Defense, Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University, Japan) durch Prof. Dr. A. Gessner (Mikrobiologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen) bereitgestellt. Mäuse wurden anschließend für mehr als 6 Generationen in C57BL6/J-Hintergrund zurückgekreuzt und als separate Homozygote weitergezüchtet.

Doppel-knockout (dKO)-Mäuse wurden durch Kreuzungen erzeugt. TLR2 KO- oder MyD88 KO-Mäuse wurden in MDR1A KO [FVB/N]-Mäuse eingekreuzt. Mäuse wurden für mehr als 7 Generationen zurückgekreuzt und anschließend als separate Homozygote weitergezüchtet (Tabelle 2.8). Umgekehrt wurden MDR1A KO- in TLR2 KO [C57BL6/J]-Mäuse für Studien am genetischen Hintergrund für mehr als 7 Generationen eingekreuzt.

Triple-defiziente-Mäuse (tKO) wurden durch Kreuzung von TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen erzeugt: TLR2/MyD88/MDR1A tKO.

Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor (ZTL) des Universitätsklinikums Essen in demselben Raum unter den gleichen strikten SPF (“*specific-pathogen-free*”) Bedingungen (frei von *murinem Norovirus* und *Helicobacter*) mit einem konstanten 12 Stunden hell/dunkel-Zyklus gehalten. Temperatur und Luftfeuchtigkeit in der Umgebung wurden strikt kontrolliert. Mäuse wurden in Filtertop-Käfigen gehalten. Futter und Wasser wurden autoklaviert und waren für die Mäuse *ad libidum* verfügbar. Der Gesundheitszustand wurde routinemäßig (mind. 2x jährlich) an repräsentativen Mäusen und “*Sentinels*” überprüft (Gesellschaft für innovative Mikroökologie, mbH Wildenbruch).

In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 5 und 10 Wochen untersucht, außer wenn anders aufgeführt. Diese zwei Zeitpunkte wurden gewählt, um frühe mukosale Veränderungen vor Colitisentwicklung (5 Wochen) und

späte mukosale Veränderungen während aktiver Erkrankung (10 Wochen) im Vergleich zu untersuchen.

Für Studien zur oralen Therapie mit PCSK wurde der parentale Taconic-Stamm der MDR1A KO-Mäuse direkt eingesetzt (wie angegeben).

Alle Tierexperimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Entsprechende Tierversuchsgenehmigungen für alle Versuche liegen vor (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen).

Tabelle 2.8 Mausstämmе

Stammname	Gendefizienz	genetischer Hintergrund	Generation der Rückkreuzung
MDR1A KO	MDR1A	FVB/N	>7
TLR2/MDR1A dKO	TLR2 MDR1A	FVB/N	>7
MyD88/MDR1A dKO	MyD88 MDR1A	FVB/N	>7
TLR2/MyD88/MDR1A tKO	TLR2 MyD88 MDR1A	FVB/N	>7
TLR2 KO	TLR2	C57BL6/J	>7
TLR2/MDR1A dKO	TLR2 MDR1A	C57BL6/J	>7

2.2.2 Genotypisierung

2.2.2.1 DNA-Extraktion

Die Spitze des Mausschwanzes wurde zur Isolierung von genomischer DNA verwendet. Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* von Qiagen, entsprechend der Herstellerangaben, durchgeführt.

Kurz zusammengefasst wurde das Gewebe über Nacht bei 55°C durch Zugabe von ATL-Lysis-Puffer und Proteinase K lysiert. Am nächsten Tag wurde die DNA präzipitiert und auf Säulen des Kits übertragen. Nach zwei Waschschritten wurde die DNA durch Zugabe von 100µl AE-Puffer und anschließender Zentrifugation der Säule (8000 x g, Raumtemperatur (RT), 1 min) eluiert. Die isolierten DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Eine PCR benötigt *“template”*-DNA, dNTPs, einen PCR-Puffer für optimale Bedingungen, Mg²⁺-Ionen und eine hitzestabile Polymerase sowie einen vorwärts- und rückwärts-gerichteten Primer, die beide die Region umschließen, die es zu amplifizieren gilt.

Die PCR beginnt mit einem Denaturierungsschritt, der von 30-40 Replikationszyklen gefolgt wird. Jeder Replikationszyklus besteht aus 3 Schritten: 1. Denaturierung, 2. *“Annealing”* und 3. Elongation. Die Denaturierung benötigt hohe Temperaturen, um die doppelsträngige DNA in einzelne Stränge zu schmelzen. Im *“Annealing”*-Schritt binden die Primer spezifisch an die Zielsequenz der DNA. Die optimale Temperatur für diesen Schritt wird durch die Größe und die Sequenz der Primer bestimmt. Im Elongationsschritt, ergänzt die Polymerase den DNA-Strang, indem sie dNTPs komplementär zum *“template”*-Strang einbaut. Wenn der DNA-Strang vollkommen doppelsträngig vorliegt, fängt der Zyklus wieder von vorne an.

Die Genotypisierung für die Gene TLR2 und MyD88 wurde mit Hilfe der *Platinum Taq Polymerase* durchgeführt. Die MDR1A-Genotypisierung wurde mit der *Hot Star Taq Polymerase* durchgeführt. **Tabelle 2.9** führt das Pipettierschema für jeden PCR-Ansatz auf.

Tabelle 2.9 Pipettierschema für die Genotypisierungs-PCRs

Stock	Volumen	Endkonzentration
<u>TLR2:</u>		
10x Puffer –MgCl ₂	4µl	1x
50mM MgCl ₂	1,6µl	2mM
10mM dNTP Mix	1µl	0,25mM
8µM Primer IMR3041	5 µl	1µM
8µM Primer IMR3043	5 µl	1µM
8µM Primer IMR3091	5 µl	1µM
5U/µl Platinum Taq DNA Polymerase	0,2µl	0,025 U/µl
H ₂ O	18,2µl	
<u>MDR1A:</u>		
10x Puffer	2,5 µl	1x
10mM dNTP Mix	0,5 µl	0,20mM
8µM Primer MDR1AS2	1,6 µl	0,5µM
8µM Primer MDR1AKO2	1,6 µl	0,5µM
8µM Primer MDR1AW2	1,6 µl	0,5µM
5U/µl Hot Star Taq DNA Polymerase	0,25µl	0,05U/µl
H ₂ O	17,45µl	
<u>MyD88:</u>		
10x Puffer –MgCl ₂	4 µl	1x
50mM MgCl ₂	1 µl	2mM
10mM dNTP Mix	1.6µl	0,25mM
8µM Primer P1 or P3	1 µl	0,2µM
8µM Primer P2	1 µl	0,2µM
5U/µl Platinum Taq DNA Polymerase	0,2µl	0,025 U/µl
H ₂ O	31,2µl	

Für die MDR1A-Genotypisierung wurden 25µl PCR-Mix, für die TLR2- und MyD88-Genotypisierungen wurden jeweils 40µl PCR-Mix verwendet. Jedes Reaktionsgefäß

wurde mit 2µl DNA versetzt. Die PCR lief in einem Thermocycler mit folgenden Programmen:

TLR2:

94°C	3 min		
94°C	30 s	}	35 Zyklen
63°C	45 s		
72°C	45 s		
72°C	5 min		
4°C	∞		

MDR1A:

95°C	15 min		
94°C	45 s	}	35 Zyklen
60°C	60s		
72°C	60 s		
72°C	5 min		
4°C	∞		

MyD88:

94°C	2.5 min		
94°C	30 s	}	40 Zyklen
66°C	60s		
72°C	60 s		
72°C	10 min		
4°C	∞		

Die Proben wurden bis zur Gelelektrophorese bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Gelelektrophorese

Mit einer Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente anhand ihrer Größe auftrennen. Beim Aushärten des Agarosegels kommt es zur Bildung von kleinen Poren. Die Porengröße hängt von der Agarosemenge ab: je höher die Agarosekonzentration, desto kleiner die Poren. DNA-Fragmente werden in die Ladungstaschen des Gels gegeben und durch das Anlegen eines elektrischen Feldes im Gel aufgetrennt. Die negativ geladene DNA wandert durch das Gel zum positiv geladenen Pol der Gelkammer. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller als größere. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel, können DNA-Banden unter dem ultravioletten (UV)-Licht sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und fluoresziert bei Anregung unter UV-Licht.

Die Methode der Gelelektrophorese wurde zur Genotypisierung verwendet. Hierfür wurde Agarose (2%) in 1xTAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem zwei Tropfen Ethidiumbromid pro 50ml Gellösung zugegeben wurden, wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen. Kämme wurden in der Apparatur eingehängt, um Taschen für die Beladung mit DNA-Proben zu formen. Nach Aushärtung wurde das Gel mit 1xTAE-Puffer bedeckt. Die PCR-Produkte wurden mit *6x Orange Loading Dye* gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Ein DNA-*“ladder”* wurde ebenfalls aufgetragen als Referenz für die Fragmentgrößen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 90 Volt für 30-45 Minuten. Die Größe der PCR-Produkte wurde im Geldokumentationssystem unter UV-Licht anhand des DNA-*“ladders”* bestimmt. Die Anwesenheit von WT- und KO-Banden wurde untersucht. Gelbilder wurden mit Hilfe der *Phoretix™ grabber Software* erstellt.

2.2.3 Mauspräparation und Gewebeisolation

Mäuse wurden durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran tief und schmerzfrei betäubt. Nach der Bestimmung des Körpergewichts wurde das Abdomen zügig geöffnet. Dünn- und Dickdarm, Leber und Milz wurden entfernt. Die noch tiefbetäubten Mäuse wurden sofort durch zervikale Dislokation getötet. Die Colonlänge (einschließlich Caecum) und Milzgewicht wurden bestimmt. Das Colon wurde in 5 gleichgroße Stücke geteilt, die unterschiedlich weiterverarbeitet wurden (Abb. 2.1): jeweils ein distales und ein proximales Stück wurden in *Tissue-Tek® O.C.T Compound* eingebettet und in flüssigem Stickstoff für die Anfertigung von

Gefrierschnitten gefroren. Der linke Leberlappen wurde ebenfalls in *Tissue-Tek*® *O.C.T Compound* eingebettet.

Je ein distales und ein proximales Colonstück wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren zur späteren Proteinisolation und als Reservematerial. Das mittlere Stück Colon und ein Stück terminales Ileum (Teil des Dünndarms) wurden über Nacht in *RNAlater*® inkubiert und anschließend bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert.

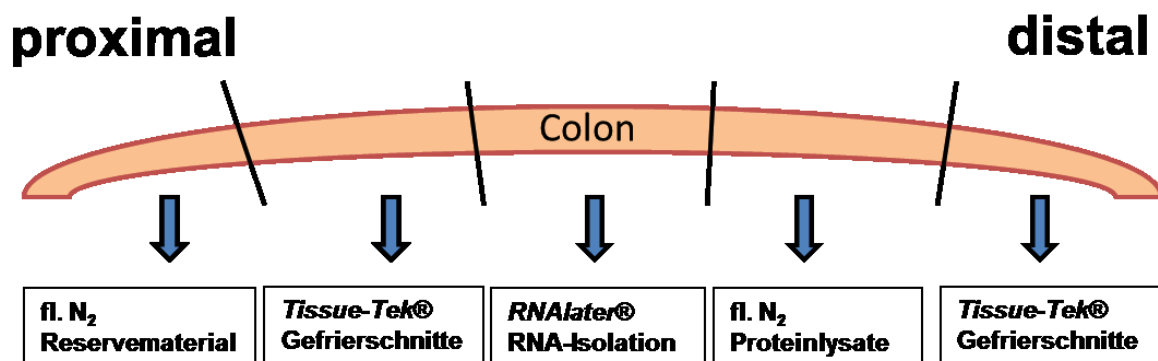


Abb. 2.1 Präparation des Colons (ohne Caecum).

Das Colon wurde herauspräpariert und in 5 Stücke geteilt. Von proximal nach distal wurden die Stücke in flüssigem Stickstoff (fl. N₂) schockgefroren, in *Tissue-Tek*® für Gefrierschnitte eingebettet, in *RNAlater*® für RNA-Isolation inkubiert, in flüssigem Stickstoff für Proteinlysate schockgefroren oder in *Tissue-Tek*® für Gefrierschnitte eingebettet.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte (7µm) der Gewebe wurden an einem *MICROM HM 560 Kryostat* angefertigt. Schnitte wurden auf *Superfrost® Plus Gold* Objektträger aufgenommen und bei -20°C bis zur Durchführung der Färbung gelagert.

2.2.4.2 Hematoxylin-Eosin-Färbung

Die Hematoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine standardisierte Routine-Färbetechnik, um sich einen histologischen Überblick über Gewebe verschaffen zu können. Die Zellkerne werden hierbei durch das Hematoxylin blau gefärbt. Eosin, eine saure Farbe, färbt basische Strukturen wie das Zytoplasma von Zellen, Collagen und Muskelfasern rot an.

Die H&E-Färbung wurde mit dem *Fast Frozen Stain Kit* von Polysciences nach Herstellerangaben durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden die Schnitte fixiert und mit Hematoxylin angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in alkalischem Scott's Bluing Reagent inkubiert und mit Eosin gegengefärbt. Die Schnitte wurden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Xylenersatz geklärt. Objektträger wurden mit *CitraMount™ Medium* eingedeckelt und unter dem *Nikon Eclipse E600 Mikroskop* beurteilt. Repräsentative Bilder wurden mit einer *Nikon Digital Sight DS-U1 Kamera* gemacht und mit *NIS-Elements BR 3.0 Software* in standardisiertem Format verarbeitet und gespeichert.

2.2.4.3 Histologie-“Score”

Der Histologie-“Score” wurde anhand der Kriterien in [Tabelle 2.10](#) bestimmt.

Tabelle 2.10 Kriterien für den Histologie-“Score”

Kriterien	Score	Definition
Epithel	0	Normale Morphologie
	1	Verlust an Becherzellen in kleinen Arealen
	2	Verlust an Becherzellen in großen Arealen
Kryptenabszesse	0	Keine Kryptenabszesse
	1	1 Kryptenabszess
	2	> 1 Kryptenabszess
Infiltration	0	Keine Infiltration
	1	Infiltration an der Basis der Krypten
	2	Infiltration bis zur Lamina Propria Muscularis Mucosae
	3	Massive Infiltration bis zur Lamina Muscularis Mucosae
	4	Infiltration der Lamina Submucosa
Verdickung der Mukosa	0	Keine Verdickung (WT=25% des 20x-Sichtfeldes)
	1	25-50%
	2	50-75%
	3	>75%

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Mit der mikroskopischen Technik der Immunfluoreszenzfärbung lassen sich Verteilung und Lokalisation von Proteinen in Geweben und Zellen visualisieren. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung detektiert ein spezifischer Primärantikörper das gesuchte Protein. Ein fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Sekundärantikörper bindet anschließend an den Primärantikörper.

Gefrierschnitte wurden bei -20°C entweder mit Aceton (100%) oder Aceton/Methanol (50%/50%) fixiert. Für die F4/80-Färbung wurden Schnitte für 10 Minuten in Aceton bei RT fixiert. Die Objektträger wurden dann luftgetrocknet und die Schnitte wurden mit einem *ImmEdge PEN* umrandet. Ausplattierte Peritoneal-Zellen auf "*Culture Slides*" wurden für 15 Minuten mit 4% PFA/Wasser bei RT fixiert. Nach Rehydrierung der Schnitte bzw. Zellen mit DPBS (ohne Ca^{2+} & Mg^{2+}), wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit 10% normalem Ziegenserum (NGS) oder 10% normalem Eselserum in DPBS (je nach verwendetem Sekundärantikörper) geblockt.

Der Primärantikörper und die entsprechende IgG-Kontrolle wurden in 1% Serum in DPBS verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten bzw. Zellen inkubiert (Tabelle 2.3, Seite 47).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte bzw. Zellen dreimal mit DPBS für je 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in 1% Serum in DPBS, s. Tabelle 2.4, Seite 48) für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Objektträger wurden erneut dreimal für je 5 Minuten gewaschen und anschließend mit Fluoreszenz-Eindeckmedium, das DAPI enthielt, um die Zellkerne anzufärben, eingedeckelt. Die Objektträger wurden mit Nagellack abgedichtet.

Die Färbung wurde unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (*LSM 510*, Zeiss) analysiert. Bei den 40x- und 63x-Vergrößerungen (Plan-Neofluar 40x/1.3, DIC Objektiv; 63x/1.4, DIC Objektiv) wurde Öl verwendet. Um Interferenzen der Chromophore zu eliminieren, wurden die Multitrack-Option des Mikroskops und sequentielles Scanning für jeden Kanal verwendet. Die Intensität der Laser wurde anhand der Isotypen-IgG-Kontrollen eingestellt und Bilder wurden mit der *Zeiss LSM 510 v.3.2 Software* gemacht. Identische Laser- und standardisierte

Mikroskopeinstellungen wurden für alle Bilder derselben Färbung verwendet. Die Bilder wurden mit der *Adobe Photoshop CS4 Version 11.01 Software* in standardisiertem Format abgespeichert.

2.2.6 Genexpressionsanalyse

2.2.6.1 Isolation von Ribonukleinsäure

Die Genexpression wurde durch die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) und anschließender Real-Time quantitativer Reverser-Transkriptions-PCR (Realtime qRT-PCR) analysiert. Im Allgemeinen existiert "messenger"-RNA (mRNA) nur für Gene, die aktiv transkribiert werden, und spiegelt daher die Aktivität von Zellen wider. Um die RNA zu isolieren, müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Gleichzeitig müssen RNasen inaktiviert werden, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Das *TRI Reagent®*, das Guanidiniumthiocyanat enthält, ermöglicht beides gleichzeitig: es lysiert die Zelle und inaktiviert RNasen. Phenol, das ebenfalls in *TRI Reagent®* enthalten ist, löst Proteine und DNA, die nach Zugabe von 1-Bromo-3-chloropropan (BCP) in anschließender Phasentrennung von der RNA getrennt werden können. Schließlich wird die RNA durch Ethanol präzipitiert und, nach mehreren Waschschritten zum Entfernen restlicher Verunreinigungen, eluiert.

Gewebestücke, die in *RNAlater®* bei -80°C gelagert wurden, wurden für die RNA-Isolation verwendet. Für die Isolation wurde das *RiboPure™ Kit* von Ambion verwendet und die anschließende Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Kit* von Qiagen, beide größtenteils nach Herstellerangaben.

Die Gewebestücke wurden in 1ml *TRI Reagent®* homogenisiert und für 10 Minuten bei RT inkubiert, um das Gewebe zu lysieren. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (12.000 x g, 10min, 4°C), und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1-Bromo-3-chloropropan (BCP) wurde zu den Proben gegeben und gründlich gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4°C) zur Phasentrennung. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von Ethanol präzipitiert, anschließend auf Glasfaser-Säulen des *RiboPure™ Kits* gegeben und zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4°C). Die Säulen wurden zwei Mal mit Waschlösung aus dem Kit gewaschen. Die RNA wurde

mit 100µl eines Elutions-Puffers mit niedrigem Salzgehalt eluiert. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 1min, RT) der Säule wurde das Eluat auf Eis aufbewahrt, bis mit dem zweiten Kit zur Aufreinigung der RNA fortgefahren wurde.

Eine Mischung aus β-Mercaptoethanol und RLT-Puffer aus dem *RNeasy Kit* (Qiagen) wurde in einem 1/100 Verhältnis angesetzt und auf die Proben gegeben, um RNasen zu eliminieren. Ethanol wurde zur Präzipitation der RNA hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend auf Säulen mit Silikon-Gel-Membranen transferiert, zentrifugiert (10.000 x g, 30s, RT) und einmal mit dem RW1-Puffer des Kits gewaschen. Um mögliche DNA-Kontamination in den Proben zu eliminieren, wurden die Proben mit einer Mischung aus DNase in RDD-Puffer behandelt, das zur Verdauung der DNA führt. Nach Inkubation (15 min, RT) wurden die Säulen drei Mal gewaschen. RNA wurde schließlich in 200-400µl RNase-freiem Wasser eluiert, je nach ursprünglicher Größe des Gewebestücks.

Die RNA-Konzentration und -Reinheit der Proben wurde an einem Photometer mit den Wellenlängen 260nm, 280nm und 320nm bestimmt. Für die Verwendung der Proben in Realtime qRT-PCRs wurden Proben auf 50ng/µl verdünnt.

Da die Gruppe der 10 Wochen alten MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse aus einer sehr großen Anzahl an Tieren bestand, wurden für die Realtime qRT-PCR jeweils zwei RNA-Proben von Mäusen desselben Genotyps mit ähnlichem Histologie-“Score” zusammengefasst.

2.2.6.2 Realtime quantitative Reverse-Transkriptions-PCR

Das mRNA-Profil einer Zelle spiegelt wider, welche Gene aktiv transkribiert werden. Die Realtime qRT-PCR quantifiziert die Genexpression, indem es die Menge einer spezifischen mRNA untersucht.

Bei dem natürlich ablaufenden Prozess der Transkription wird eine DNA-Sequenz mit Hilfe des Enzyms RNA-Polymerase in einen einzelsträngigen mRNA-Strang umgeschrieben, der wiederum zur Proteinsynthese dient. Bei der Reversen Transkription wird dieser Prozess umgekehrt. Hierbei wird mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in einen komplementären copy-DNA (cDNA)-Strang transkribiert. Spezifische Primer werden in einer anschließenden PCR verwendet, um nur die gesuchte cDNA zu amplifizieren. Der Realtime qRT-PCR-Puffer enthält den

Bestandteil “*SYBR-Green*”, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und dabei fluoresziert. Das abgegebene Fluoreszenzsignal wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen, um die Menge der cDNA zu quantifizieren, und erlaubt daher Rückschlüsse auf die ursprüngliche Menge an mRNA. Die Zykluszahl, in der das Fluoreszenzsignal über einen bestimmten Schwellenwert steigt, ist der Ct-Wert. Dieser Wert wird für die Quantifikation verwendet. Ein kleinerer Ct-Wert deutet auf eine größere Menge an cDNA hin. Am Ende des PCR-Programms wird die Schmelzkurve der amplifizierten Stränge untersucht, um zwischen möglichen Primer-Dimeren und spezifischem Produkt zu unterscheiden.

Folgendes Pipettier-Schema wurde für jede Realtime qRT-PCR-Reaktion verwendet:

Quanti Fast SYBR Green RT-PCR Master Mix (2x)	7,5µl
RT-Mix	0,1µl
RNase-freies Wasser	3,9µl
QuantiTect Primer Assay	1,5µl
RNA	2µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	15µl

Die Realtime qRT-PCR lief auf einem *Mastercycler® ep realplex* von Eppendorf. In einem ersten Schritt bei 50°C für 10 Minuten wurde die RNA revers in cDNA transkribiert. Danach folgten 40 PCR-Zyklen (95°C 10s; 60°C 30s), um die cDNA mit spezifischen Primern zu amplifizieren. Daten, die die Fluoreszenzintensität betrafen, wurden am Ende jedes PCR-Zyklus gesammelt. Der letzte Schritt des PCR-Programms bestand aus einem langsamen Erhitzen auf 95°C. Während dieses Schrittes wurden alle 0,5°C Daten zur Schmelztemperatur gesammelt.

Die Expression verschiedener Gene (Tabelle 2.2, S.46) wurde im Verhältnis zum “*housekeeping*”-Gen Gapdh untersucht. Die Kopienzahlen der amplifizierten cDNA

wurden mit Hilfe von zuvor einprogrammierten Standardkurven berechnet und in Relation zu 100.000 Kopien des “housekeeping”-Gens Gapdh gesetzt.

2.2.7 Proteinexpressionsanalyse

2.2.7.1 Proteinlysate und Proteinkonzentration

Um Proteinlysate herzustellen, wurden murines Gewebe und Zellen in *M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent*, der Phosphatase Inhibitoren (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablette, Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablette, 2mM PMSF) enthielt, lysiert und homogenisiert. Nach mindestens 5 Minuten Inkubation auf Eis, wurden die Proteinlysate zentrifugiert (12,000 x g, 10min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Dephosphorylierung von Cx43 in Gewebelysaten erfolgte in einem einstündigen Inkubationsschritt bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1U/µg).

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt. Dafür wurden 800µl Wasser mit 200µl *Bio-rad Protein-Assay* gemischt und 2-5µl vom totalen Proteinlysat hinzugegeben (2µl bei Gewebelysaten, 5µl bei Zelllysaten). Die Proteine interagieren mit dem Bradford-Reagenz und bilden einen Komplex, der zu einem Farbumschlag und daher zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums führt. Die Verschiebung ist proportional zur Proteinmenge.

Eine Standardkurve wurde durch eine Verdünnungsreihe von BSA bei 595nm am Photometer erstellt. Die Absorption der Proben, die mit dem *Bio-rad Protein-Assay* inkubiert wurden, wurde bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Der Standard ließ Rückschlüsse auf die genaue Proteinkonzentration der Proben zu.

2.2.7.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode zur Untersuchung der Proteinexpression. Dabei werden Proteine in einem diskontinuierlichen SDS (“sodium dodecyl sulfate”)-Gel anhand ihrer Größe getrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Mit spezifischen Antikörpern können Proteine detektiert und sichtbar gemacht werden. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen. Dieser Antikörper wird

wiederum vom Sekundärantikörper detektiert, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist (*“horseradish peroxidase”*; HRP). Chemilumineszenz-Reagenzien bilden ein Substrat für das Enzym. Bei der Umsetzung des Substrats durch das Enzym wird Licht an den Stellen erzeugt, an denen der Antikörper-HRP-Komplex vorliegt. Diese Lichtreaktion kann auf Röntgenfilmen eingefangen werden. Je höher die Proteinmenge ist, desto schneller erscheint das Signal und desto stärker ist es. Der Western-Blot kann Informationen liefern über die Anwesenheit bestimmter Proteine, Modifikationen dieser Proteine (z.B. Phosphorylierung) und über Unterschiede in der Proteinmenge zwischen mehreren Proben.

Gleiche Proteinmengen (100µg bei Colongewebe, 10µg bei Makrophagen-Zelllysate) wurden mit Wasser auf dasselbe Volumen gebracht. Anschließend wurden die Proben mit 4xLDS Proben-Puffer, der eine Farbe zum Verfolgen des Laufs im Gel enthielt, und DTT, einem reduzierenden Reagenz, versetzt. Proben wurden bei 85°C für 5 Minuten denaturiert. Die Proteinlysate wurden anschließend in die Taschen eines 10-well 4-12% Bis-Tris Gels geladen und für 75 Minuten bei 160 Volt aufgetrennt. Die Marker *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* und *MagicMark™ XP* wurden ebenfalls auf das Gel geladen, um den Gellauf visuell zu kontrollieren sowie zur späteren Bestimmung der Proteingröße.

Die Proteine wurden mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (*“Blotting”*). Um die Bindungseigenschaften der Membran zu erhöhen, wurde die PVDF-Membran vor dem Blotting-Prozess für mindestens 10 Minuten in Methanol inkubiert. Der genaue Aufbau des Blots ist in [Abb. 2.2](#) dargestellt. Transferpuffer wurde in die Kammer gefüllt, die Membran und Gel enthielt. Zum Kühlen wurde Wasser in die umgebende Kammer gefüllt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 30V für 90 Minuten. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation mit 5% Magermilchpulver in PBST oder TBST (je nach Primärantikörper) geblockt. Der Primärantikörper ([Tabelle 2.5](#), S.48) wurde in Milch-Blockpuffer verdünnt und mit der Membran über Nacht auf einem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für je 5 Minuten mit PBST oder TBST gewaschen, um nicht-gebundene Antikörperreste zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten spezies-spezifischen Sekundärantikörper ([Tabelle 2.6](#), S.49) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nachdem ungebundene

Antikörperreste durch Waschen entfernt wurden, wurden Chemilumineszenz (ECL)-Reagenzien gemischt und unmittelbar danach für eine Minute auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in eine Röntgenfilmkassette gelegt und die Lichtreaktion wurde durch Filmentwicklung in der Dunkelkammer eingefangen. Filme wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten unter Rotlicht entwickelt, indem sie zuerst in Entwickler-Lösung gelegt wurden, bis sich Proteinbanden zeigten. Die Filme wurden dann kurz in Wasser gewaschen und für ca. 5 Minuten in Fixier-Lösung gelegt. Danach wurden die Filme unter laufendem Leitungswasser für mindestens 5 Minuten gewaschen und bei 37°C getrocknet.

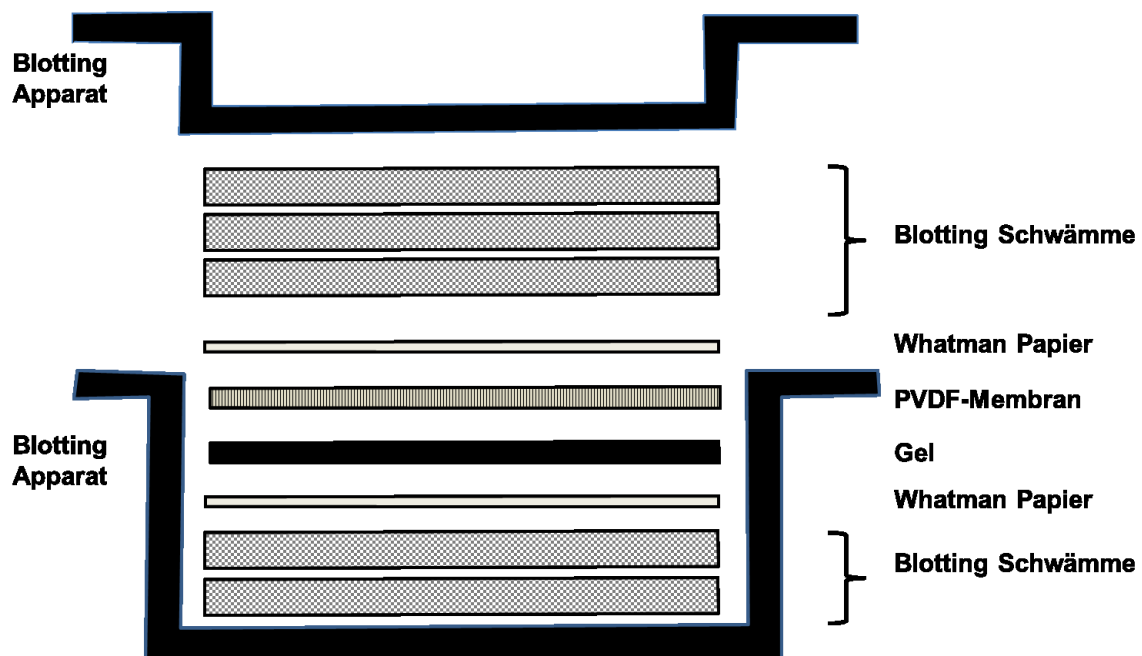


Abb. 2.2 Western-Blot-Aufbau

2.2.7.3 "Protein-Array"

Die Methode des "Protein-Array" erlaubt die gleichzeitige Detektion zahlreicher Proteine in einer Probe. Verschiedene Antikörper sind an bestimmten Punkten auf einer Membran gebunden und immobilisiert. Die Inkubation von Proteinlysaten mit den Membranen führt zur Bindung der entsprechenden Proteine an die Stellen mit spezifischen Antikörpern. Die gebundenen Proteine werden anschließend mit einer

Mischung aus biotinylierten Antikörpern inkubiert. Die Komplexe werden mit Chemilumineszenz-Reaktionen sichtbar gemacht.

Zwei verschiedene "*Protein-Arrays*" wurden in dieser Studie verwendet. Der *RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array 6* detektiert 97 verschiedene Zytokine und wurde zur Untersuchung der Zytokinexpression im Colongewebe von 5 Wochen alten WT, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen verwendet. Der *RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array 3* detektiert 62 Zytokine und wurde zur Analyse der Zytokinexpression im Colongewebe von WT-, MDR1A KO- und PCSK-behandelten MDR1A KO-Mäusen und in Zellkulturüberständen der T-Zellen von MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen verwendet.

Beide Kits wurden nach Herstellerangaben mit gleichen Proteinmengen (100µg bei Colongewebe, 100µl Überstand bei kultivierten T-Zellen aus der LP) durchgeführt. Die Membranen des Kits wurden für 30 Minuten bei RT mit dem Blockpuffer des Kits inkubiert. Die Membranen wurden dann mit 1ml der Probe (in Blockpuffer verdünnt) 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membranen wurden drei Mal für je 5 Minuten mit Waschpuffer I aus dem Kit unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Membranen zwei Mal für 5 Minuten mit 2ml Waschpuffer II gewaschen. Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht mit 1ml biotinyliertem Antikörper-Mix inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer I und II wurden 2ml HRP-gekoppeltes Streptavidin auf die Membranen gegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend folgten fünf Wachschrritte mit Waschpuffer I und II. Zur Visualisierung der Antikörper-Antigen-Komplexe wurden die Detektions-Puffer C und D gemischt und für 2 Minuten auf die Membranen gegeben. Anschließend wurden Röntgenfilme, wie oben beschrieben, in der Dunkelkammer entwickelt.

2.2.8 Zellisolation und Zellkultur

2.2.8.1 Isolation von Lamina Propria Lymphozyten mit Glaswoll-Säulen

Da die Zellzahl der LP-Lymphozyten (LPL) sehr gering ist, wurden für die Isolation 4-6 Tiere gleichen Genotyps zu einer Probe zusammengefasst. Die Därme wurden längs aufgeschnitten und mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen. Die Därme wurden dann mit Dispase-Lösung durch Inkubation unter ständigem Schütteln (125 rpm) für 50 Minuten bei 37°C verdaut, um das Epithel zu entfernen (Nguyen et

al. 2007). Der Überstand wurde verworfen und das Colongewebe wurde mit Hilfe von Rasierklingen und Objektträgern zerrieben, um eine homogene Lösung zu erhalten. Die Proben wurden in Dispase/Collagenase-Lösung für 50 Minuten bei 37°C verdaut und anschließend abzentrifugiert (500 x g, 5min, 4°C). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets wurden mit DPBS gewaschen und in LPL-Medium resuspendiert. Die Proben liefen anschließend über Glaswoll-Säulen, um große Colonstücke herauszufiltern, während Einzelzellen durchgelassen wurden. Hierfür wurde Glaswolle locker in 10ml-Spritzen gesteckt. Mit Hilfe eines 3-Wege-Hahns und einer 20G-Nadel lief die Zellsuspension langsam durch die Säulen (ca. 1 Tropfen pro Sekunde). Nachdem die durchgelaufenen Zellen gesammelt wurden und 30 Minuten auf Eis inkubierten, wurden die Proben abzentrifugiert (500 x g, 5min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, um ein dichtes Zellpellet zu erhalten. Die verschiedenen Zelltypen wurden anhand ihrer Dichte mit einem Percollgradient getrennt. Für die obere Phase wurde das Zellpellet in 5ml 45% Percoll/RPMI gelöst. Anschließend wurden 2,5ml 72% Percoll/RPMI vorsichtig unter die obere Phase pipettiert. Die Dichtezentrifugation erfolgte ohne Bremse (700 x g, 20min, 10°C), um eine klare Phasentrennung zu ermöglichen. Die Interphase, die LPL enthielt, wurde abgenommen und in ein frisches Falcon transferiert. Zellen wurden zwei Mal mit Kultur-Medium (Leibovitz, 10% FCS und 1% P/S) gewaschen und zentrifugiert (500 x g, 5min, 4°C). Die Zellen wurden zur späteren T-Zell-Anreicherung in 2%FCS/DPBS resuspendiert. Die Zahl der lebenden Zellen wurde unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau ermittelt. Trypanblau färbt lediglich tote Zellen tief blau an, während lebende Zellen leuchtend weiß bleiben. Im Detail wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt. 10µl dieser Mischung wurden in die Neubauer-Zählkammer gegeben und lebende Zellen wurden in einem 4x4 Quadrat ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

Zellzahl pro ml = Gezählte Zellzahl (in 4x4 Quadrat) x 2 (Verdünnungsfaktor, da 1:1 mit Trypanblau verdünnt) x 10.000 (Kammerfaktor)

2.2.8.2 Isolation von Lamina Propria Lymphozyten mit Zellsieben

Das Colon von 12 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurde in Stücke geschnitten und durch ein 100µm Zellsieb gedrückt. Anschließend wurde mit FACS-Puffer (2%FCS/DPBS) nachgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt (500 x g, 5

min, 4°C) wurden Zellen mit 1,5µg/ml DNaseI behandelt (15min, 37°C). Anschließend wurden Zellen gewaschen, in Ammoniumchlorid resuspendiert und 3 Minuten auf Eis inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren. Zellen wurden anschließend zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen, nochmals über ein 100µm Zellsieb laufen gelassen und in FACS-Puffer resuspendiert. Lebende Zellen wurden mit Trypanblau, wie oben beschrieben, gezählt.

2.2.8.3 Isolation von Peritoneal-Makrophagen

Die Peritoneal-Makrophagen von 5-6 Wochen alten MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden mit einer Peritoneal-“*Lavage*” isoliert unter Verwendung von 7ml eiskaltem Kulturmedium (Leibovitz, 10% FCS und 1% P/S) bzw. Makrophagen-Medium (Macrophage Medium + 1%P/S). Nach Einschnitt ins Peritoneum und Wieder-Aufsaugen der “*Lavage*”-Flüssigkeit, wurden die Zellen abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4°C), in Ammoniumchlorid resuspendiert und 3 Minuten auf Eis inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit Kulturmedium bzw. Makrophagen-Medium gewaschen und anschließend resuspendiert. Lebende Zellen wurden mit Trypanblau, wie oben beschrieben, gezählt.

2.2.8.4 T-Zell-Anreicherung

Zur Isolation von Zellpopulationen können magnetische Partikel verwendet werden. Dabei sind Antikörper, die gegen bestimmte Zellen gerichtet sind, an magnetische Partikel gekoppelt. Die Zellfraktion kann dann mit einem Magneten isoliert werden. Wenn die zu untersuchende Zellfraktion mit den magnetischen Partikeln markiert ist und mit Hilfe des Magneten von ungewollten Zellen separiert wird, spricht man von *positiver Selektion*. Wenn hingegen die magnetischen Partikel gegen ungewollte Zellen gerichtet sind, die durch den Magneten entfernt werden, und die gewünschte Zellpopulation unmarkiert bleibt, spricht man von *negativer Selektion*.

Das *EasySep® Mouse T cell Enrichment Kit* von Stem Cell Technologies ist ein Kit zur *negativen Selektion* von T-Zellen. Der Antikörper-Cocktail enthält biotinylierte Antikörper gegen nicht-T-Zellen (CD11b, CD19, CD45R/B220, CD49b, TER119).

Die T-Zell-Anreicherung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden alle isolierten LP Zellen (aus 2.2.8.1) mit 2%FCS/DPBS auf ein Gesamtvolumen von

1ml gebracht und mit 50µl T-Zell Enrichment-Cocktail und 50µl Ratten-Serum versetzt (beide waren im Kit enthalten). Die Proben wurden 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100µl Biotin-Selection-Cocktail zu den Proben gegeben und ebenfalls 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mit 50µl Nanopartikeln versetzt und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die Proben mit 2%FCS/DPBS aufgefüllt und die Reaktionsgefäße wurden für 5 Minuten in den Magneten gesetzt, um magnetisch-markierte nicht-T-Zellen zu eliminieren. Der Überstand wurde in ein frisches Probengefäß überführt und erneut für 5 Minuten in den Magneten gesetzt. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Typanblau, wie oben beschrieben, gezählt.

2.2.8.5 Kultivierung von T-Zellen aus der Lamina Propria

Die angereicherten T-Zellen wurden auf einer 96-Well-Platte mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät und für 60 Stunden bei 37°C ohne CO₂ kultiviert. Der Überstand der T-Zellen wurde für die Untersuchung des Zytokin/Chemokin-Profiles in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.8.6 Ausplattieren von Peritoneal-Makrophagen auf Culture Slides

Die isolierten Peritoneal-Makrophagen wurden in Makrophagen-Medium aufgenommen, auf *8-Well-Poly-D-Lysin Culture Slides* von BD Bio Coat™ mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well ausgesät und 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis die Zellen adhärent waren. Nicht adhärente Zellen wurden anschließend durch Absaugen des Mediums entfernt. Adhärente Peritoneal-Makrophagen wurden für die CD11b-Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

2.2.8.7 Stimulation von Peritoneal-Makrophagen mit LPS

Isolierte Peritoneal-Makrophagen wurden auf einer 12-Well-Platte mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Well ausgesät. Ein Teil der Zellen blieb als Kontrolle unstimuliert, der andere Teil wurde mit 1µg/ml LPS für 20 Stunden bei 37°C ohne CO₂ stimuliert.

Am nächsten Tag wurden die adhärenenten Zellen für die Western-Blot-Analyse mit Proteinlysis-Puffer lysiert (M-PER + Phosphatase Inhibitoren + Protease Inhibitoren + 2mM PMSF).

Für die durchflusszytometrische Messung zur Untersuchung der Reinheit, wurden Zellen direkt aus der 12-Well-Platte geerntet und in FACS-Puffer (DPBS +2% FCS) suspendiert. Hierfür wurde 1ml Dissociation Buffer auf die Zellen gegeben und mind. 5 Minuten bei 37°C inkubiert, um die adhärenenten Zellen von den Platten zu lösen. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer durch rauf- und runterpipettieren vollständig von der Platte gelöst, in ein Falcon übertragen, und abzentrifugiert (500 x g, 5min, 4°C). Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und lebende Zellen wurden mit Trypanblau, wie oben beschrieben, gezählt.

2.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die gleichzeitige Analyse mehrerer Komponenten von einer großen Anzahl an Zellen. Die Zellen laufen dabei in einem Einzelzell-Flüssigkeitsstrom durch das Gerät und passieren dabei einen Laserstrahl. Das Durchflusszytometer detektiert die Granularität und Größe der Zellen, indem es die unterschiedlichen Muster analysiert, in dem Zellen den Lichtstrahl streuen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt Rückschlüsse auf die Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (SSC) abhängig von der Granularität der Zelle ist. Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht des Weiteren die gleichzeitige Detektion von verschiedenen Antigenen durch die Verwendung fluoreszierender Antikörper. Fluorochrom-gekoppelte Antikörper binden spezifisch an zelluläre Antigene. Die Fluorochrome werden mit Laserstrahlen angeregt. Ein Teil des Lichtes wird von den Fluorochromen absorbiert, der Rest wird emittiert. Das abgegebene Licht wird detektiert und das Signal wird mit der Software verarbeitet. Einzel-Ereignisse werden durch das Gerät gezählt und in einem Koordinatensystem als einzelne Punkte dargestellt (*Dot-Plot*). Bestimmte Populationen können durch Setzen von *“Gates”* näher betrachtet werden, während alle Zellen außerhalb des *“Gates”* vernachlässigt werden.

Die Durchflusszytometrie in dieser Studie wurde an einem *BD LSRII*-Durchflusszytometer mit *BD FACSDiva™ Software* durchgeführt. Das *BD LSRII*-Durchflusszytometer ist mit verschiedenen Lasern zur Anregung der Fluorochrome

ausgestattet. Der blaue Argonionen-Laser (*Coherent Sapphire™*) mit einer Wellenlänge von 488nm regt die Fluorochrome FITC, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5 und Alexa Fluor® 488 an Licht zu emittieren. Der rote Helium-Neon-Laser (*JDS Uniphase 1344P*) mit einer Wellenlänge von 633nm regt APC, APC-Cy7, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 750 und APC-eFluor®780 an und der violette Laser mit einer Wellenlänge von 405nm (*Coherent Radius™405*) regt Pacific Blue und DAPI an. Die in dieser Studie verwendeten Fluorochrome waren APC, APC-Cy7 und PerCP-Cy5.5. Vor der Messung wurde mit Kompensations-“Beads” von BD Pharmingen kompensiert, um überlappende Spektrenbereiche zu korrigieren. Die Vorwärts-Streuung (FSC) und Seitwärts-Streuung (SSC) wurden so eingestellt, dass alle messbaren Zellen im “Dot-plot” sichtbar waren. Der Schwellen-Wert für die Messung wurde so gesetzt, dass kleine Zellbruchstücke ausgeschlossen wurden und Hintergrundstörungen minimiert wurden. Tote Zellen wurden in manchen Versuchen mit *LIVE/DEAD® Fixable Near IR Stain* von Molecular Probes angefärbt. Dieser Farbstoff färbt lebende Zellen nur schwach an. Tote Zellen werden dagegen stark angefärbt, da sich der Farbstoff im Inneren von geschädigten Zellen ansammelt. *Flowjo v7.5.5 Software* wurde für die Auswertung verwendet.

Zur Untersuchung der Reinheit der Peritoneal-Makrophagen wurden 1×10^6 Zellen pro FACS-Röhrchen eingesetzt. Die Zellen wurden einmal in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert ($1.500 \times g$, 5 min, 4°C) und in 100µl Fc-Block/DPBS (1/50 Verdünnung) aufgenommen. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

Anschließend wurden die extrazellulären Antikörper dazugegeben (CD11b-PerCP-Cy5.5) (Tabelle 2.7) und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen und in 200µl 0,5%PFA/DPBS suspendiert, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen wurden bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

Die Doppelfärbung für CD11b und IL-1β wurde freundlicherweise von Stephanie Weber aus der AG Göthert der Hämatologie an der Uniklinik Essen durchgeführt. Hierfür wurden die LPL (aus 2.2.8.2) in 40µl *LIVE/DEAD® Fixable Near IR Stain* (APC-Cy7) (Molecular Probes) aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis mit Fc-Block (1/50 Verdünnung) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu

blocken. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem anti-CD11b-PerCP-Cy5.5-Antikörper (Tabelle 2.7) für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Anschließend folgte die intrazelluläre Färbung. Hierfür wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für 20 Minuten auf Eis in 100µl Cytofix/Cytoperm von BD Pharmingen inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Perm Wash von BD Pharmingen gewaschen und mit dem anti-IL-1 β -APC-Antikörper für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden einmal mit Perm Wash gewaschen, anschließend in FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer durch Dr. med Joachim Göthert und Stephanie Weber gemessen. Die Rohdaten wurden für die weitere Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.2.10 Serumanalyse

Das Blut wurde direkt aus dem Herzen von 6 Wochen alten Mäusen isoliert. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und das Herz wurde mit einer Spritze punktiert. Das Blut wurde in Heparin-Gefäße gegeben, um Agglutination zu vermeiden, und anschließend zentrifugiert (10.000 x g, 10min, RT). Der Überstand wurde bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Messung der Leberwerte im Serum wurde mit 250µl Serum und den SPOTCHEM™ Leberprofil Multistreifen an einem SPOTCHEM™ EZ SP-4430 durchgeführt.

2.2.11 Therapieansätze

2.2.11.1 Behandlung mit dem IL1R-Antagonisten Anakinra

Um den IL-1 β -Signalweg zu blockieren, wurden 5 Wochen alte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse täglich subkutan mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra (Kineret®) injiziert. Die Mäuse erhielten 100mg pro kg Körpergewicht in einem Volumen von 100µl für 28 Tage und wurden im Alter von 9 Wochen getötet. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse erhielten tägliche Injektionen mit isotonischer Kochsalzlösung.

2.2.11.2 Antibiotikabehandlung

Antibiotika wurden in autoklaviertem Trinkwasser nach dem Protokoll von B. Sartor (Rath et al. 2001) verabreicht. Im Detail wurden TLR2/MDR1A dKO-Mäuse 8 Wochen lang mit den Breitbandantibiotika *Zienam*® und *Vancomycin-ratiopharm*® behandelt. Die prophylaktische Behandlung startete im Alter von 3 Wochen unmittelbar nach dem Absetzen, die therapeutische Behandlung im Alter von 18 Wochen, in dem TLR2/MDR1A dKO-Mäuse bereits eine fulminante Colitis entwickelt hatten. Eine Flasche jedes Antibiotikums wurde in 100ml sterilem Wasser gelöst. Den Mäusen wurden 10ml jedes Antibiotikums in 250ml autoklaviertem Trinkwasser verabreicht. Wasser wurde zwei Mal pro Woche gewechselt. Nach 8 Wochen der Antibiotikabehandlung wurden die Mäuse getötet und untersucht.

2.2.11.3 Behandlung mit dem TLR2-Liganden PCSK

Der TLR2-Ligand PCSK wurde in autoklaviertem Trinkwasser verabreicht. Im Detail wurden MDR1A KO-Mäuse (ursprünglicher Taconic Stamm) über eine Dauer von 20 Tagen mit 150µg/ml PCSK behandelt. Die Behandlung startete an Tag 47pp (7 Wochen) und endete an Tag 67pp (10 Wochen). Das Wasser wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die Mäuse wurden im Anschluss an die Behandlung getötet und untersucht.

2.2.12 Statistik

Die Daten wurden mit *Microsoft Excel* gesammelt und mit *GraphPad Software* (*GraphPad Prism, version 4.03, GraphPad software, San Diego, CA*) statistisch analysiert. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test berechnet. Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der TLR-mRNA-Expression in Colitis von MDR1A KO-Mäusen

Initial wurde der Effekt von MDR1A-Defizienz auf die TLR-mRNA-Expression im Colon während chronischer Entzündung untersucht. Die mRNA wurde aus dem Colon von 15-22 Wochen alten, männlichen MDR1A KO-Mäusen (ursprünglicher Taconic Stamm) und gleichaltrigen WT-Kontrollen isoliert. Die Genexpression verschiedener TLRs wurde auf mRNA-Ebene in Real-Time qRT-PCRs untersucht. Wie in Abb. 3.1 gezeigt, war TLR2-mRNA im entzündeten Colon von MDR1A KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen signifikant hochreguliert. TLR9-mRNA war ebenfalls hochreguliert, aber die relative Gesamtkonzentration auf Genebene war gering und daher vernachlässigbar. Hingegen blieb die mRNA-Genexpression von TLR1, TLR4, TLR5 und TLR6 zwischen den beiden Gruppen unverändert.

Diese Daten deuteten darauf hin, dass TLR2 eine Rolle in der Colitis-Pathogenese bei MDR1A-Defizienz spielen könnte.

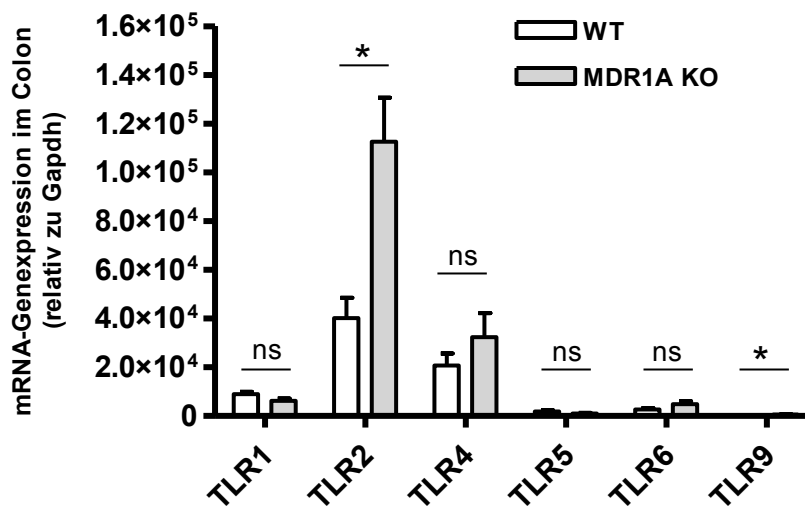


Abb. 3.1 mRNA-Genexpression von verschiedenen TLRs im entzündeten Colon von MDR1A KO-Mäusen im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen.

RNA wurde aus dem mittleren Colon von 15-22 Wochen alten WT- und MDR1A KO-Mäusen (ursprünglicher Taconic Stamm) isoliert und auf die Genexpression von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR9 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR9 wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (n=4 Mäuse pro Genotyp) dargestellt. *p<0,05, ns: nicht signifikant.

3.2 Genotypisierung der unterschiedlichen KO-Mausstämme

Um die Rolle von TLR2 in der Colitis-Pathogenese bei MDR1A-Defizienz weiter zu untersuchen, wurden TLR2 KO [C57BL6/J]- und MyD88 KO [C57BL6/J]- für mehr als 7 Generationen in MDR1A KO [FVB/N]-Mäuse eingekreuzt und anschließend als homozygote Stämme weitergezüchtet (Tabelle 2.8, Seite 51). Kontroll-MDR1A KO-Mäuse, die das TLR2-Gen exprimieren, stammten als “littermates” aus der Rückkreuzung und wurden ab >F7-Generation separat weitergezüchtet. Die Genotypisierung wurde mittels PCR unter Verwendung von allel-spezifischen Primern durchgeführt, wie in *Material und Methoden* beschrieben. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt. Ein repräsentatives Bild eines Genotypisierungsergebnisses ist in Abb. 3.2 dargestellt.

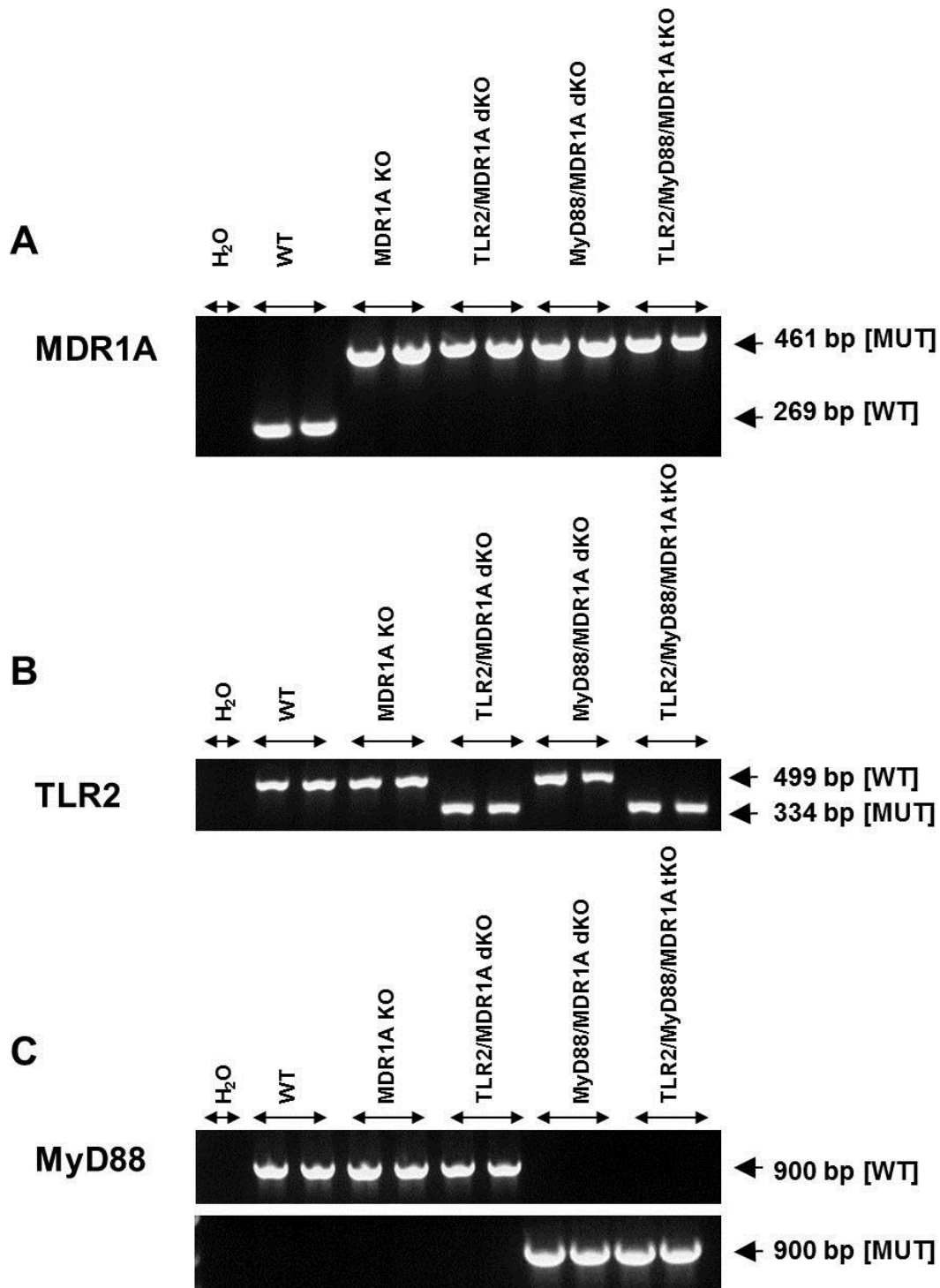


Abb. 3.2 Genotypisierung von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO-, MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen mit PCR.

Genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzen von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO-, MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben. Genotypisierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung von allel-spezifischen Primern für die Gene MDR1A (A), TLR2 (B) und MyD88 (C). Eine repräsentative Genotypisierung mit n=2 pro Gruppe ist hier exemplarisch abgebildet.

3.3 Phänotypisierung der unterschiedlichen KO-Mausstämme im Verlauf

3.3.1 Klinische Parameter

Nach erfolgreicher Generierung der unterschiedlichen Mausstämme, wurden Entwicklung und Verlauf der chronischen Colitis anhand verschiedener klinischer Parameter untersucht und die Gruppen untereinander verglichen (Abb. 3.3). Fast alle KO-Mäuse wiesen im Alter von 5 Wochen ein verringertes Körpergewicht im Vergleich zu WT-Kontrollen auf (Abb. 3.3 A). Im Alter von 10 Wochen zeigten TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO- eine mangelnde Gewichtszunahme, während MDR1A KO-Mäuse im Mittelwert ein vergleichbares Körpergewicht zu WT-Mäusen aufwiesen.

Die Verkürzung der Colonlänge spiegelt restriktive und fibrosierende Vorgänge wider, die durch die chronische Entzündung verursacht werden, und ist ein allgemein üblicher Parameter zur Bestimmung der Entzündungsaktivität bei muriner Colitis (Okayasu et al. 1990; Cario et al. 2007). Im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen zeigten einige MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse bereits im Alter von 5 Wochen eine signifikante Verkürzung der Colonlänge, welche sich im Verlauf deutlich verstärkte (Abb. 3.3 B). Des Weiteren waren neben der Reduktion der Colonlänge bei MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen im Alter von 10 Wochen auch diarrhoe-typische Symptome zu beobachten (weicher Faeces im Darmlumen). Hingegen verkürzte sich das Colon in der Gruppe der MyD88/MDR1A dKO-Mäuse nicht signifikant.

Die Splenomegalie gehört zwar nicht zu den Manifestationsformen humaner chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, im murinen Modell der chronischen MDR1A-defizienten Colitis tritt sie jedoch regelmäßig in Erscheinung (Resta-Lenert et al. 2005; Masunaga et al. 2007) und wird allgemein als Folge der systemischen Immunreaktion bei chronischer Colitis gesehen. 42% aller MDR1A KO- und 60% aller TLR2/MDR1A dKO-Mäuse entwickelten ab 5 Wochen eine Splenomegalie (>150 mg), d.h. Zunahme der Milzgröße und -gewicht (Abb. 3.3C). Im Vergleich zu WT-Kontrollen waren die Milzen von MyD88/MDR1A dKO-Mäusen jedoch zu keinem der beiden untersuchten Zeitpunkte im Mittelwert signifikant vergrößert (lediglich 10% zeigten im Alter von 5 Wochen eine Splenomegalie). Neben der Splenomegalie, wiesen einige 10 Wochen alte MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse auch eine

mesenteriale Lymphadenopathie (vergrößerte Lymphknoten) auf (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wiesen sowohl MDR1A KO- als auch TLR2/MDR1A dKO-Mäuse bereits früh klinische Anzeichen einer Colitis auf – mit Reduktion der Gewichtszunahme, Verkürzung der Colonlänge und Zunahme des Milzgewichts. Es wurden jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten MyD88/MDR1A dKO-Mäuse – trotz geringerer Gewichtszunahme – keine Veränderungen der Colonlänge und des Milzgewichts und verhielten sich damit klinisch wie WT-Kontrollmäuse.

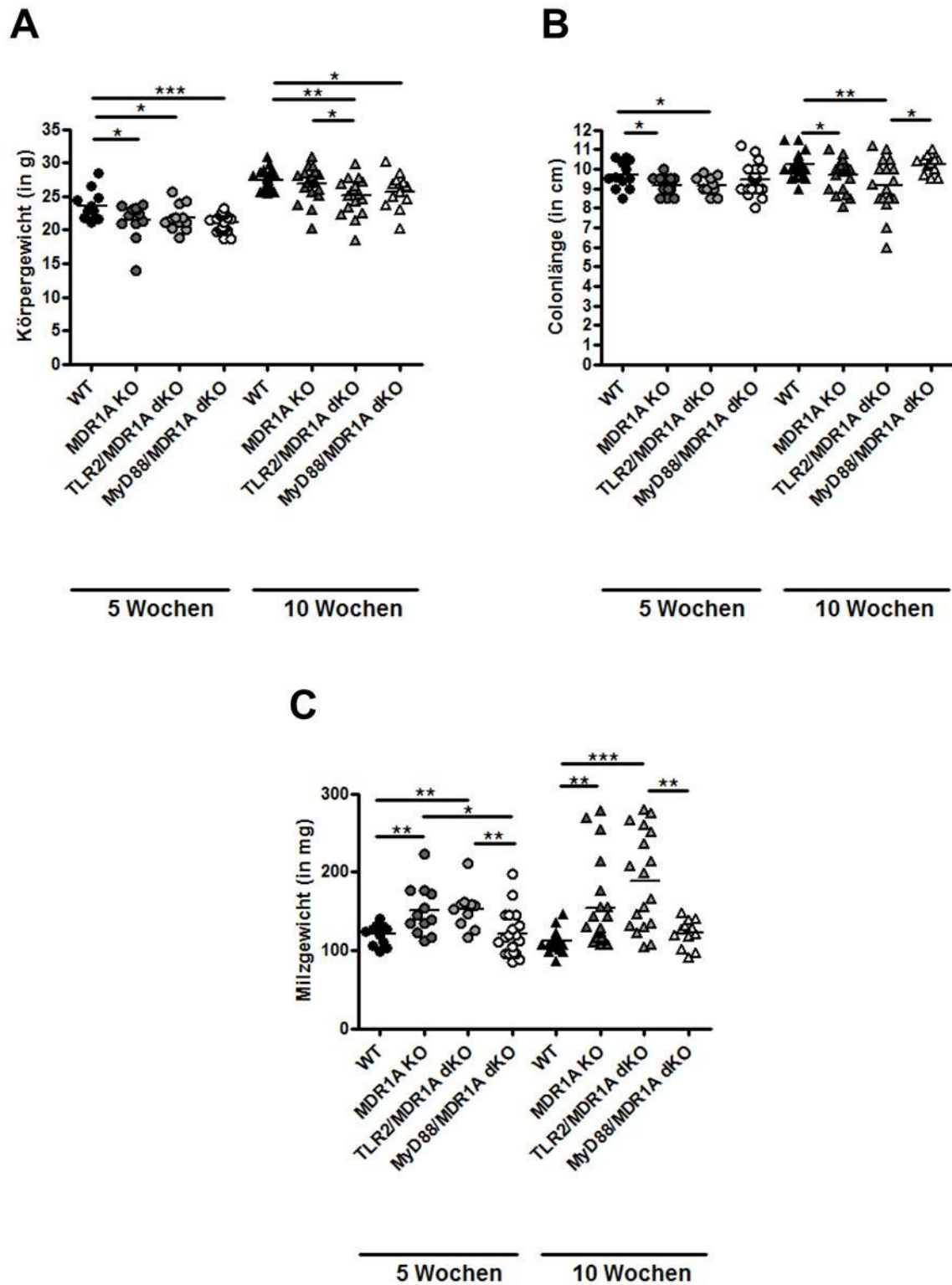


Abb. 3.3 Klinische Parameter von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen.

Körpergewicht (A), Colonlänge (B) und Milzgewicht (C) von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen wurden im Alter von 5 vs. 10 Wochen bestimmt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3.2 Histopathologie des Colons

Zur Beurteilung des histologischen “Scores” als Maß des Entzündungsgrades, wurde ein distales Stück des Colons jeder Maus im Alter von 5 vs. 10 Wochen entfernt. Gefrierquerschnitte des distalen Colons wurden angefertigt, mit H&E angefärbt und unter dem Mikroskop bewertet (Abb. 3.4). Dabei wurden Epithelschaden und das Ausmaß der inflammatorischen Zellinfiltration beurteilt (Tabelle 2.10). Bereits im Alter von 5 Wochen zeigten TLR2/MDR1A dKO-Mäuse erste Anzeichen einer milden Colitis (Abb. 3.4 A) - mit einem signifikant höheren mittleren Histologie-“Score” ($3,2 \pm 0,4$) (Abb. 3.4 C) als alle anderen Genotypen. Die Colitis in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zeigte eine deutliche Progression, so dass TLR2/MDR1A dKO-Mäuse rapide eine fulminante Pancolitis entwickelten (Abb. 3.4 B). Dies spiegelte sich in einem hohen Histologie-“Score” im Alter von 10 Wochen wider ($7,9 \pm 0,89$). Hingegen entwickelten MDR1A KO-Mäuse bis 10 Wochen nur eine geringgradig ausgeprägte Colitis ($3,3 \pm 0,6$). MyD88/MDR1A dKO-Mäuse entwickelten bis zum Alter von 10 Wochen keine Anzeichen von Colitis ($1,3 \pm 0,5$) – vergleichbar zu WT-Kontrollen.

Im Detail war die erhöhte Colitisaktivität in 10 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen durch eine deutliche Verdickung der Mukosawand, zahlreiche Kryptenabszesse, Verlust an Becherzellen in weiten Arealen, kompensatorische Hyperplasie der Enterozyten und ausgeprägte inflammatorische Infiltrate in der LP, die über alle Schichten der Mukosa verteilt waren, gekennzeichnet (Abb. 3.4 B). Diese histopathologischen Kennzeichen der Colitis bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen erinnern an das typische Erscheinungsbild bei humaner CU (Warren und Sommers 1949; Xavier und Podolsky 2007) und sind exemplarisch in Abb. 3.5 dargestellt.

Die Daten legten somit nahe, dass der Verlust von TLR2 die Colitisaktivität und –progression bei MDR1A KO-Mäusen deutlich verstärkte. Andererseits hemmte die Deletion von MyD88 die Colitisentwicklung bei MDR1A-Defizienz.

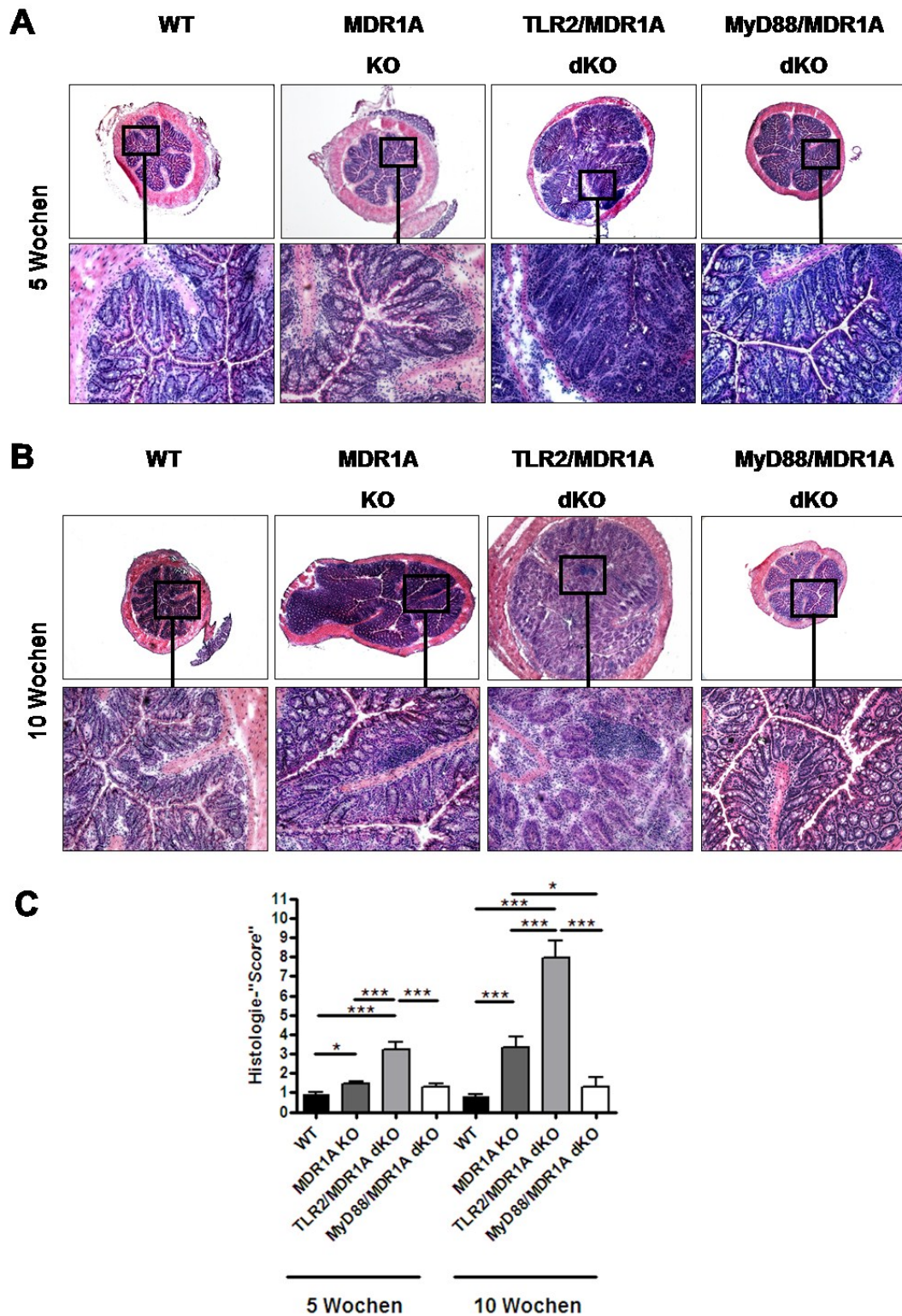


Abb. 3.4 Histopathologie der Colitisentwicklung in den unterschiedlichen KO-Mausstämmen im Alter von 5 und 10 Wochen.

Gefrierschnitte vom distalen Colon von WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und Myd88/MDR1A dKO-Mäusen im Alter von 5 Wochen (A) und 10 Wochen (B) wurden mit H&E angefärbt und unter dem *Nikon Eclipse E600-Mikroskop* beurteilt. Repräsentative Bilder sind für jeden Genotypen gezeigt (Vergrößerung: obere Reihe 4x; untere Reihe 20x). Der Histologie-„Score“ (C) wurde anhand der Kriterien in **Tabelle 2.10** bestimmt. Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 6$ Mäuse pro Genotyp) dargestellt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

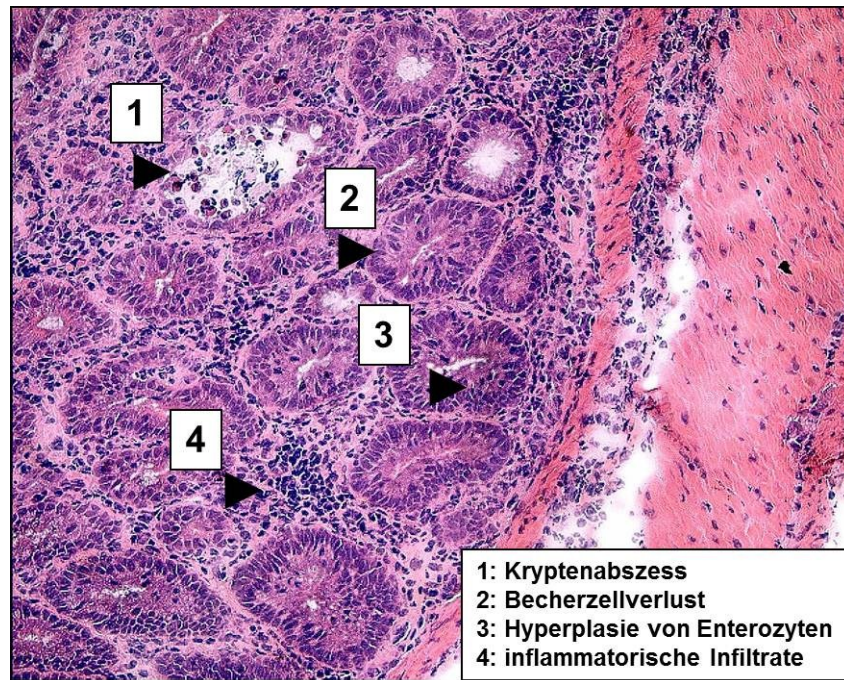


Abb. 3.5 Histopathologie der Kennzeichen fulminanter Colitisaktivität in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

Gefrierschnitte vom distalen Colon von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden mit H&E angefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Kryptenabszesse, Becherzellverlust, Hyperplasie von Enterozyten und inflammatorische Infiltrate in der LP des Colons waren hier typische Zeichen der fulminanten Pancolitis und sind in dieser exemplarischen Abbildung hervorgehoben (Vergrößerung 40x, Nikon Eclipse E600).

3.3.3 Identifizierung der Leukozyten in der entzündeten Lamina Propria

Mit voranschreitender Erkrankung zeigten TLR2/MDR1A dKO-Mäuse im Rahmen der starken Verdickung der Mukosawand einen signifikanten Anstieg an einwandernden Immunzellen in die LP des Colons. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass die CD45⁺ Infiltrate sich v.a. aus folgenden Leukozyten-Gruppen zusammensetzten: CD11b⁺-, F4/80⁺-, Gr-1⁺- und CD4⁺-Zellen (Abb. 3.6). Diese Zell-Subtypen waren bereits im Alter von 5 Wochen in der LP der TLR2/MDR1A dKO-Mäuse nachweisbar, jedoch in keinem der anderen Genotypen (Abb. 3.6 A). Am stärksten nahm die Zahl der CD11b⁺-Zellen in TLR2/MDR1A dKO zu (Abb. 3.6 A und B), die bereits früh große Zellaggregate in der LP formten. Mit zunehmendem Alter expandierten auch CD4⁺-Zellen und F4/80⁺-Zellen in der LP von TLR2/MDR1A dKO. Gr-1⁺-Zellen waren vereinzelt über die gesamte LP von TLR2/MDR1A dKO verteilt.

Im Gegensatz dazu, waren wenige CD45⁺-Immunzellen (CD11b⁺, Gr-1⁺ oder CD4⁺) im Colon von 10 Wochen alten MDR1A KO-Mäusen zu erkennen. F4/80⁺-Zellen

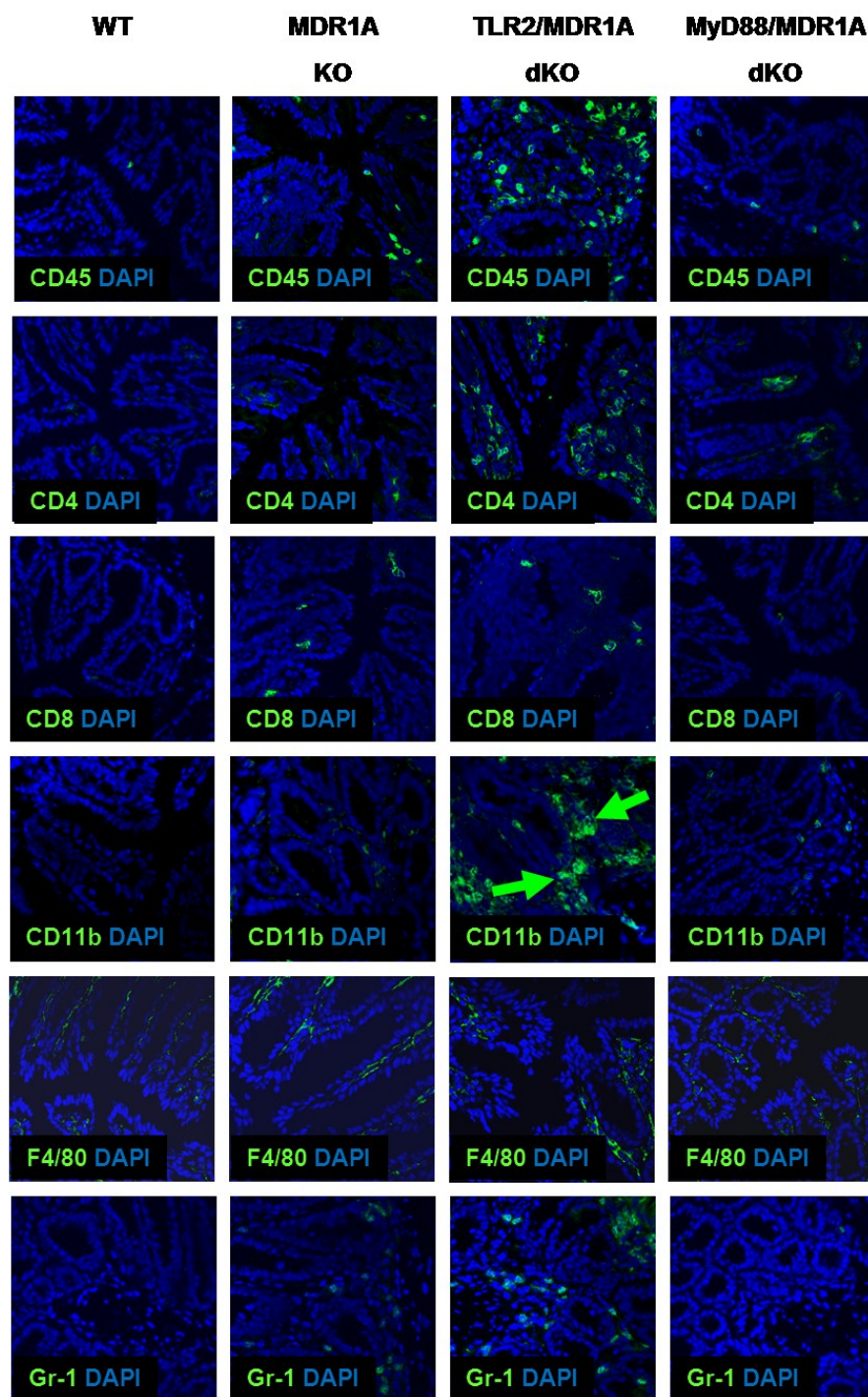
waren in den MDR1A KO-Mäusen zwar auch im Alter von 10 Wochen zahlreich vorhanden, aber insgesamt deutlich weniger als in gleichaltrigen TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

Sowohl in MDR1A KO- als auch in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen waren nur sehr vereinzelt CD8⁺-Zellen in der intestinalen Mukosa nachweisbar und es war kein Unterschied zwischen den Genotypen erkennbar.

Hingegen zeigten MyD88/MDR1A dKO- und WT-Mäuse keinerlei inflammatorische LP-Infiltrate im Alter von 5 bzw. 10 Wochen.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass die fulminante Colitis bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen durch Infiltration der LP von CD11b⁺-, CD4⁺-, F4/80⁺- und Gr-1⁺-Zellen gekennzeichnet war. Hierbei bildeten die CD11b⁺-Zellen frühzeitig die dominanten Aggregate. Expansion der CD4⁺- und F4/80⁺-Zellen folgte mit zunehmendem Alter.

A



B

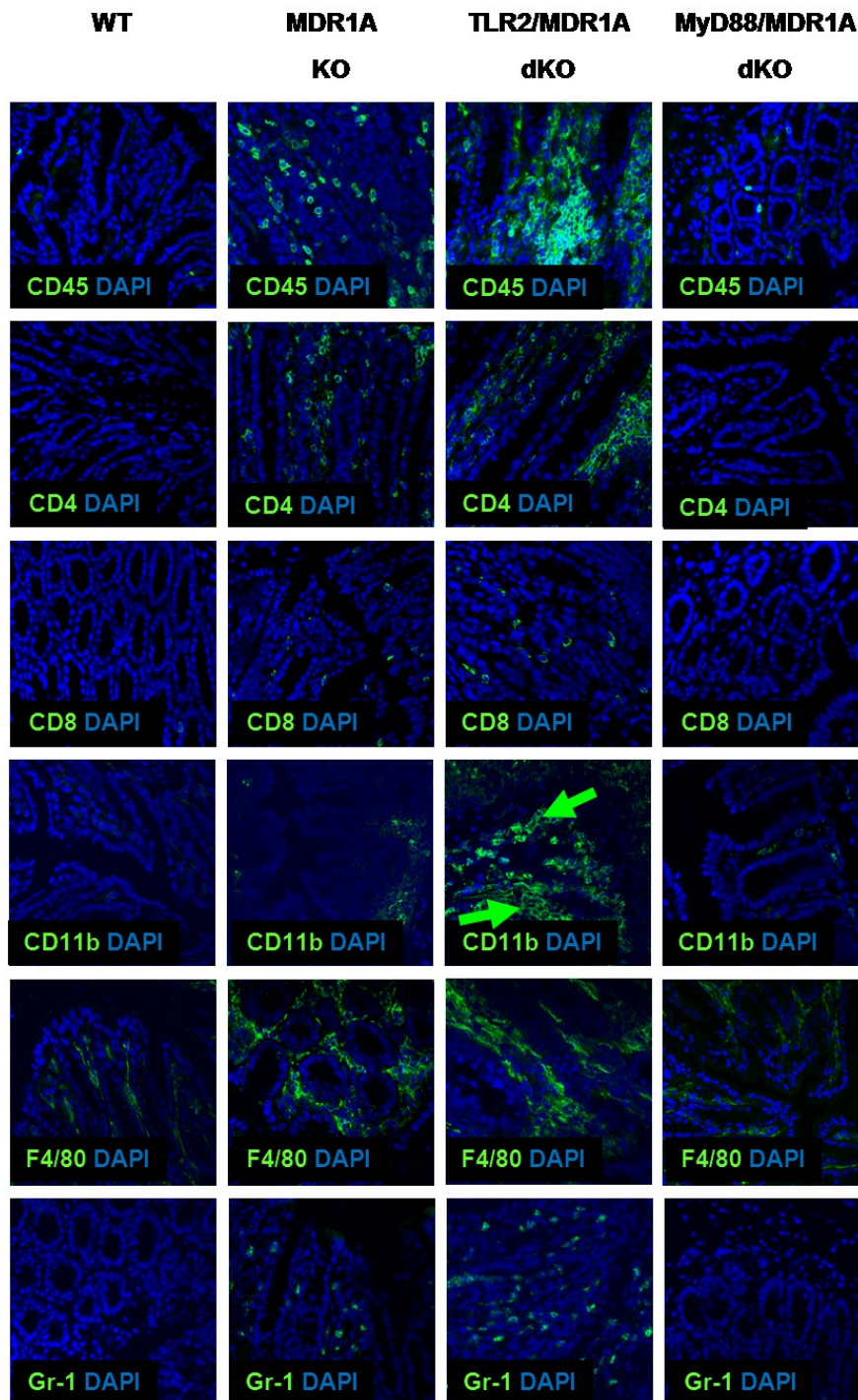


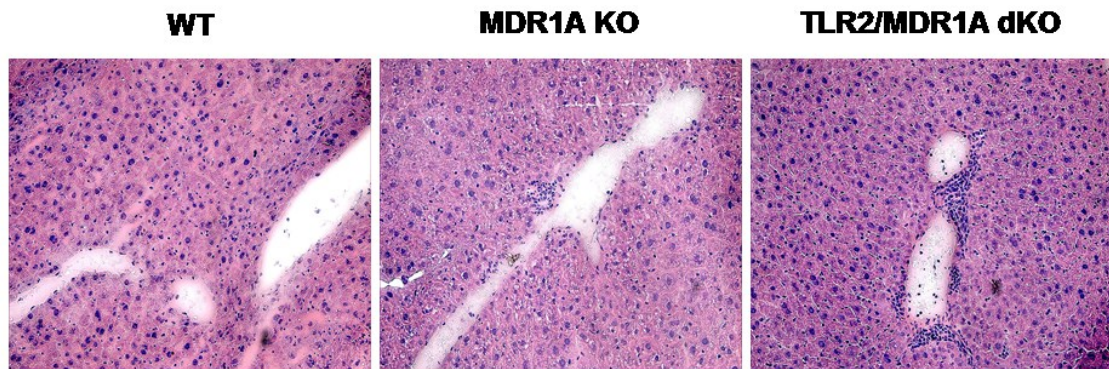
Abb. 3.6 Charakterisierung unterschiedlicher Leukozyten-Gruppen im Colon der verschiedenen Mausstämmе.

Die Verteilung von CD45⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD11b⁺-, F4/80⁺- und Gr-1⁺-Zellen (FITC: grün) in der intestinalen Lamina Propria von 5 Wochen (A) und 10 Wochen (B) alten WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Colongewebe (distal) wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Genotyp. Grüne Pfeile deuten auf die besonders großen CD11b⁺-Aggregate hin. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Beteiligung der Leber als systemische Folge

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine Erkrankung der Leber, bei der es zu Entzündungen und Vernarbungen der hepatischen Gallengänge kommt. PSC ist mit humaner CU assoziiert (Olsson et al. 1991). Um festzustellen, ob Colitis bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen ebenfalls mit einer Erkrankung der Leber verbunden ist, wurden Gefrierschnitte der Leber mit H&E angefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Fulminante Colitis bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen war mit periportalер Infiltration der Leber durch Immunzellen assoziiert (Abb. 3.7 A), die durch Immunfluoreszenzfärbung als CD4+-T-Zellen identifiziert wurden (Abb. 3.7 B). Bei der milden Colitis in MDR1A KO-Mäusen war keine periportale Entzündungsreaktion vorhanden. Die lymphozytären Läsionen entwickelten sich in großer Anzahl in 10 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen, waren jedoch nur vereinzelt in MDR1A KO-Mäusen nachweisbar. Konfluierende brückenbildende Nekrosen wurden aber nicht identifiziert. Diese Ergebnisse wiesen auf eine hepatische Beteiligung der chronischen Entzündungsreaktion hin, die am ehesten als systemische Folge der progredienten Colitis zu sehen ist.

A



B

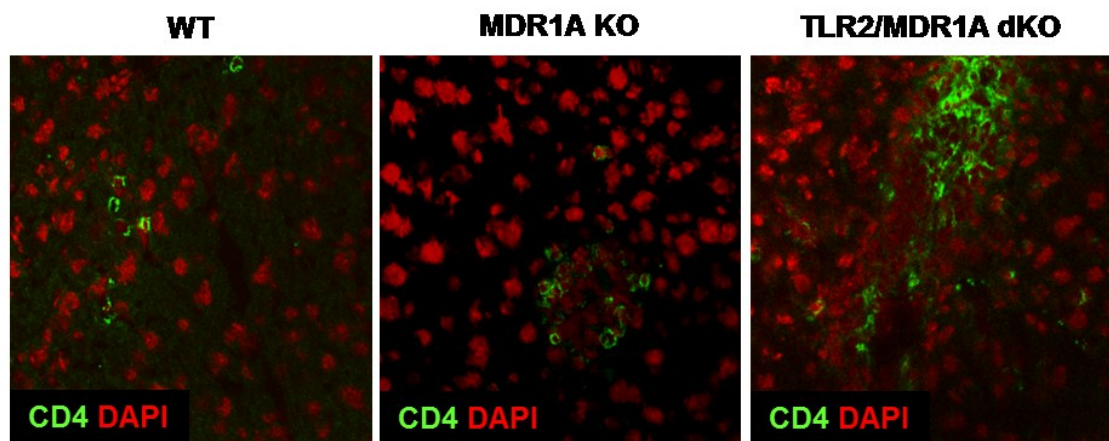


Abb. 3.7 Histopathologie der Leber von WT, MDR1A und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

Gefrierschnitte der Leber wurden mit H&E angefärbt (A) (Vergrößerung 20x, *Nikon Eclipse E600*). Periportale Infiltrate wurden mit Immunfluoreszenzfärbung (B) durch Inkubation mit anti-CD4 Antikörper (FITC: grün) charakterisiert. Zellkerne wurden mit DAPI (rot) angefärbt. (Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; *Zeiss LSM 510*). Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 5 Mäusen pro Genotyp. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Um die Leberfunktion weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Leberwerte im Serum der Mäuse bestimmt. Die Werte für totales Protein, Albumin, Bilirubin, die Lebertransaminasen AST/ALT und die Lactatdehydrogenase (LDH) waren tendenziell erniedrigt in TLR2/MDR1A dKO während sie in TLR2/MyD88/MDR1A tKO im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen eher erhöht waren (Tabelle 3.1). Dennoch lagen die abweichenden Werte noch im Normbereich, und lassen daher nicht auf eine Leberschädigung schließen.

Tabelle 3.1 Serumwerte der verschiedenen Mausstämmen.

Verschiedene Leberwerte wurden im Serum von 6 Wochen alten WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO-, MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen bestimmt.

	WT	MDR1A KO	TLR2/MDR1A dKO	MyD88/MDR1A dKO	TLR2/MyD88/MDR1A tKO
T-Pro (g/dl)	4,80 ± 0,4	4,43 ± 0,1	4,30 ± 0,1	4,67 ± 0,2	5,23 ± 0,2
Alb (g/dl)	2,27 ± 0,03	2,17 ± 0,0	1,97 ± 0,1	2,20 ± 0,1	2,27 ± 0,1
T-Bil (mg/dl)	1,13 ± 0,2	0,80 ± 0,3	0,60 ± 0,2	1,10 ± 0,3	1,43 ± 0,2
AST (IU/L)	124,00 ± 7,1	155,00 ± 37,7	84,67 ± 20,7	127,00 ± 27,7	221,30 ± 33,8
ALT (IU/L)	111,70 ± 4,4	152,00 ± 26,2	55,67 ± 5,2	99,33 ± 21,7	170,70 ± 29,4
AST/ALT	1,11	1,02	1,52	1,28	1,30
LDH (IU/L)	1528,00 ± 94,7	1611,00 ± 418,4	1029,00 ± 292,5	1361,00 ± 239,4	2206,00 ± 204,0

3.3.5 mRNA-Genexpression von Defensinen im Ileum

Bei Patienten mit MC-Ileitis ist häufig eine Dysregulation in der Expression von antimikrobiellen Defensinen zu beobachten (Wehkamp et al. 2005). Deshalb wurde die Defensinexpression mittels Real-Time qRT-PCR im Ileum von 10 Wochen alten WT, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen untersucht. Weder MDR1A KO- noch TLR2/MDR1A dKO-Mäuse zeigten eine Abweichung in der mRNA-Expression der Defensine Defcr1, Defa5, Lyz1, Lyz2, Pla2g2e und Reg3g im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen (Abb. 3.8). Dementsprechend scheint der MDR1A KO-Colitis und der TLR2/MDR1A dKO-Colitis keine Defensindysregulation zu unterliegen.

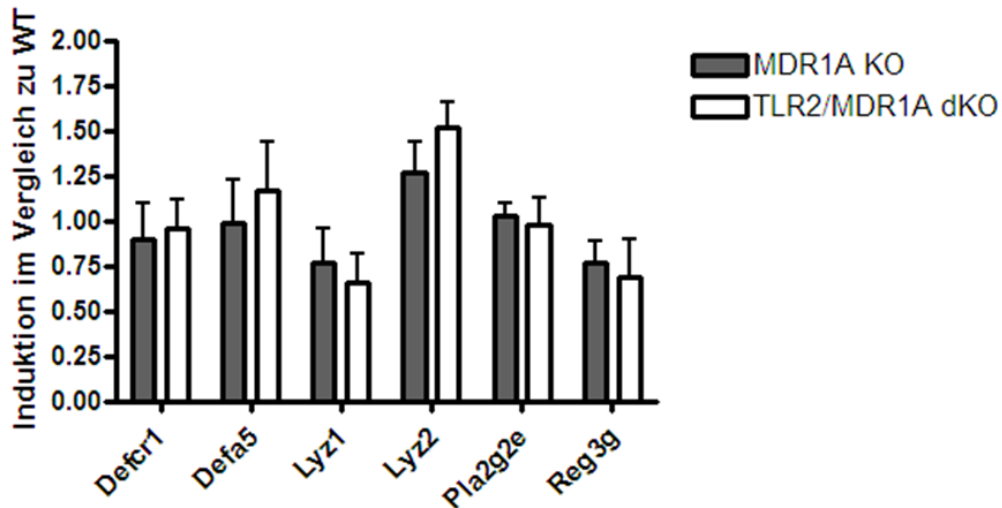


Abb. 3.8 mRNA-Genexpression von Defensinen im Ileum von 10 Wochen alten Mäusen.

RNA wurde aus dem Ileum von 10 Wochen alten WT-, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen isoliert und auf die Genexpression von Defensinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen der Zytokine wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen. Die Expression der Defensine wurde auf die Expression von WT bezogen und als -fache Induktion angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Genotyp). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3.6 mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen im Colon

Um die T-Zell-spezifische Immunantwort der LP-Zellen zu charakterisieren, wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine im Colongewebe durch Real-Time qRT-PCR untersucht.

CD3 stellt einen frühen Pan-T-Zell-Marker dar. Im Alter von 5 Wochen zeigten TLR2/MDR1A dKO-Mäuse einen signifikant höheren Anstieg der CD3-mRNA im Colongewebe als MDR1A KO-Mäuse (Abb. 3.9). Die CD3-mRNA-Expression stieg in beiden Genotypen progredient an und mit 10 Wochen war kein Unterschied mehr erkennbar. MyD88/MDR1A dKO-Mäuse zeigten hingegen im Vergleich zu WT-Kontrollen keinen Anstieg der CD3-mRNA-Expression im Colongewebe.

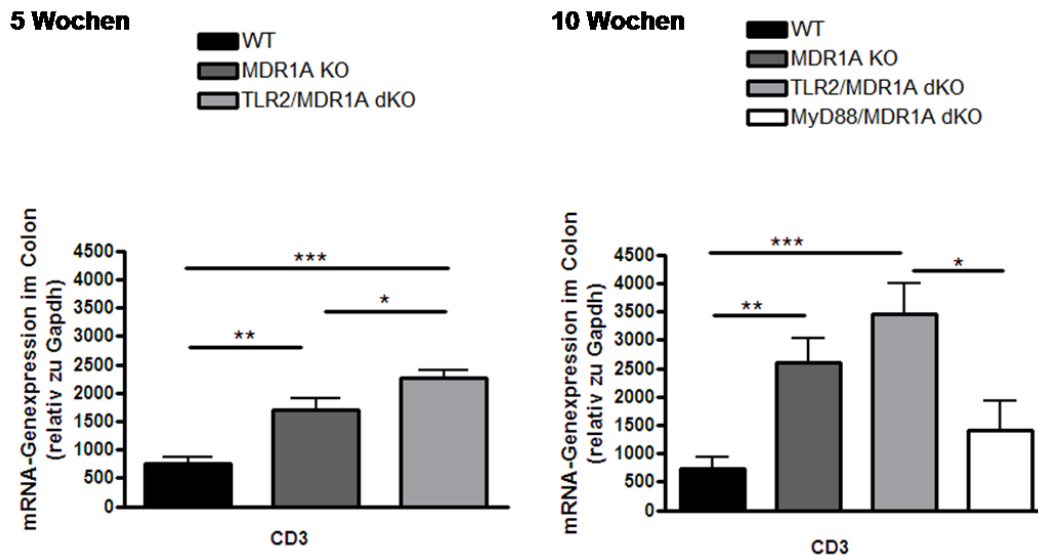


Abb. 3.9 mRNA-Genexpression von CD3 im distalen Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.

RNA wurde aus dem mittleren Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten WT-, MDR1A-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen isoliert und auf die Expression von CD3 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CD3 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Genotyp). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die nachfolgende Genexpressionsanalyse der Th1/Th2/Th17-Immunantwort zeigte, dass TLR2/MDR1A dKO-Mäuse bereits im Alter von 5 Wochen im Colon eine erhöhte mRNA-Expression der Th1-Zytokine IL-1 β , IFN- γ und IL-12 aufwiesen (Abb. 3.10 A), welche zu diesem frühen Zeitpunkt im Colon von MDR1A KO-Mäusen im Vergleich zu WT noch nicht erhöht waren. Erst im Alter von 10 Wochen wiesen auch MDR1A KO-Mäuse eine erhöhte mRNA-Expression dieser Zytokine auf. Die Th1-Zytokine IL-2 und TNF- α hingegen waren sowohl in MDR1A KO- als auch in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen erst bei 10 Wochen auf mRNA-Ebene in der intestinalen Mukosa erhöht.

Hingegen wurde die mRNA-Genexpression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10, sowie der Th17-Zytokine IL-17, IL-21 und IL-27 in keinem der untersuchten Genotypen in bedeutenden Mengen induziert (Abb. 3.10 B und C). Lediglich IL-23-Rezeptor (IL-23r) war sowohl in MDR1A KO- als auch in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen bereits im Alter von 5 Wochen hochreguliert, jedoch in vergleichbarem Maße.

MyD88/MDR1A dKO-Mäuse zeigten im Vergleich zu WT-Kontrollen keinerlei Dysregulation der Zytokin-Expression im Colongewebe im Alter von 10 Wochen (Abb. 3.10 A, B und C).

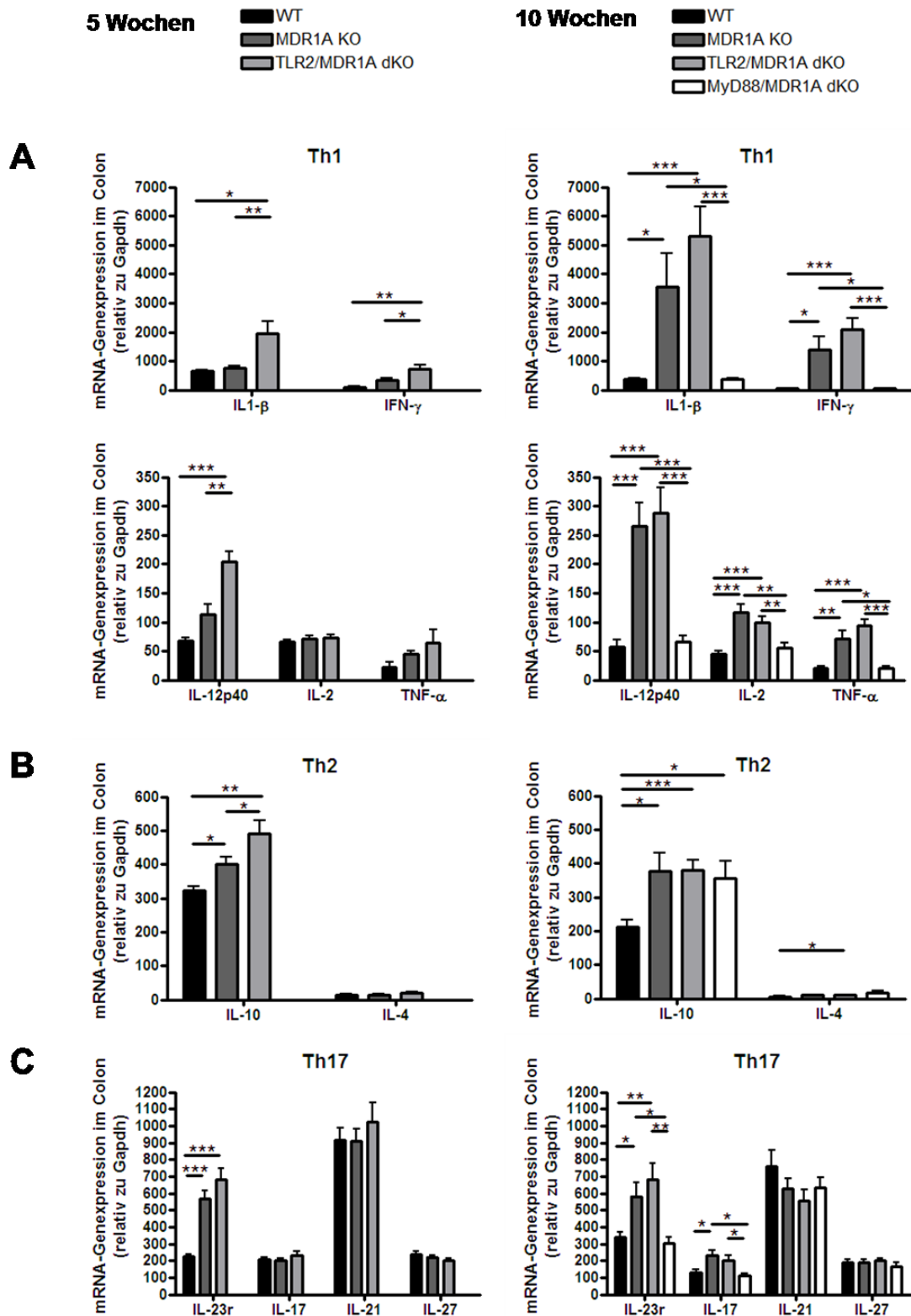


Abb. 3.10 mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17 Zytokinen im Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.

RNA wurde aus dem mittleren Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten WT-, MDR1A-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen isoliert und auf die Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen der Zytokine wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Genotyp). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Als Nächstes wurde die Expression von CCL2 auf mRNA-Ebene untersucht. CCL2 (MCP-1, “*monocyte chemotactic protein-1*”) ist ein Chemokin, das bei Entzündung ausgeschüttet wird und wichtig für die Rekrutierung verschiedener Immunzellen zum Ort der Inflammation ist (Lu et al. 1998). Im Alter von 5 Wochen wiesen MDR1A KO-Mäuse eine erhöhte Expression von CCL2-mRNA im Vergleich zu WT-Kontrollen auf. Die CCL2-mRNA-Expression von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen war jedoch noch deutlich stärker hochreguliert und nahm mit dem Alter weiter zu. Im Gegensatz dazu zeigten 10 Wochen alte MyD88/MDR1A dKO-Mäuse keine Erhöhung der CCL2-mRNA-Expression.

Zusammengefasst zeigten TLR2/MDR1A dKO-Mäuse eine frühe Verlagerung der Immunantwort in Richtung Th1, welche durch erhöhte Genexpression der Zytokine IL-1 β , IFN- γ und IL-12 charakterisiert war. Auch das Chemokin CCL2 war bereits früh erhöht. Die Regulation der Th2- und Th17-Zytokine auf mRNA-Ebene blieb hingegen größtenteils unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu, verhielt sich die Zytokin- und Chemokingenexpression im Colongewebe von MyD88/MDR1A dKO-Mäusen wie WT.

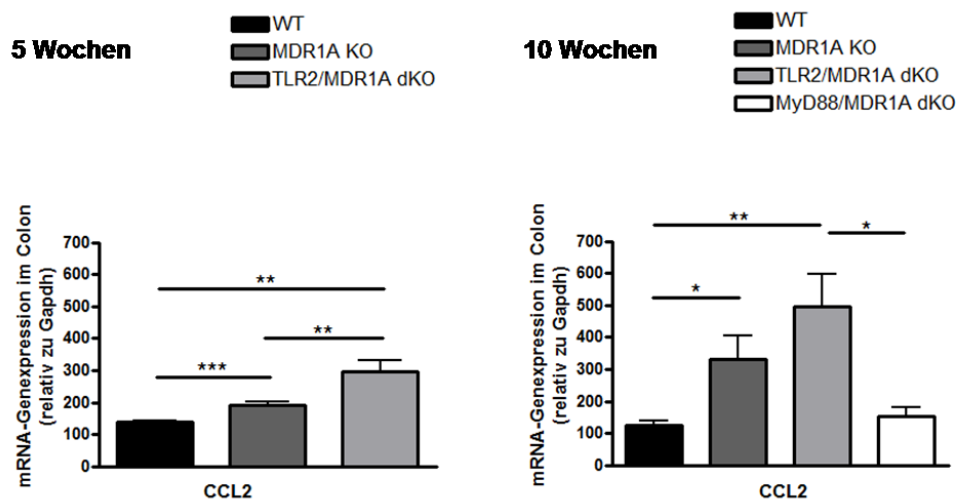


Abb. 3.11 mRNA-Genexpression von CCL2 im Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten Mäusen.

RNA wurde aus dem mittleren Colon von 5 Wochen und 10 Wochen alten WT-, MDR1A-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen isoliert und auf die Genexpression von CCL2 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CCL2 wurde für die Auswertung auf das “housekeeping”-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentrationen angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Genotyp). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3.7 Proteinexpression von Zyto- und Chemokinen im Colon

Die Expression von verschiedenen proinflammatorischen Markern wurde als Nächstes auf Protein-Ebene im Colongewebe untersucht. Hierzu wurde ein "*Protein-Array*" mit 97 verschiedenen Antikörpern eingesetzt. Mit Hilfe des "*Protein-Arrays*" konnten so gleichzeitig verschiedene Zyto- und Chemokine in totalen Lysaten von Colongewebe analysiert werden. Der "*Array*" erlaubt jedoch nicht die intra- bzw. extrazelluläre Differenzierung der Mediatorpräsenz.

Der "*Protein-Array*" bestätigte die Th1-Polarisierung in TLR2/MDR1A dKO-Därmen, wie in [Tabelle 3.2](#) dargestellt. Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zeigte eine wesentlich höhere Reaktivität gegen das Th1-Zytokin IL-12 als WT und MDR1A KO. Des Weiteren waren in Relation zu WT inflammatorische Mediatoren, wie löslicher TNF-Rezeptor I (sTNFR I) und sTNFR II, und Apoptose-Marker, wie Granzyme B, FasL und Gas6, höher in Colongeweben von TLR2/MDR1A dKO- als MDR1A KO-Mäusen exprimiert. Auch zahlreiche Chemokine, wie CCL3, CCL20, CCL22 und CXCL16, die wichtig für das Einwandern von Immunzellen in das periphere Darmgewebe sind, waren in der intestinalen Mukosa von TLR2/MDR1A dKO signifikant erhöht – nicht aber in MDR1A KO.

FcγRIIB, ein Rezeptor, der auf B-Zellen und myeloischen Zellen exprimiert wird und deren Aktivierungszustand beeinflusst (Kono et al. 2005; Niederer et al. 2010), sowie SPINT1, ein Faktor, der in regenerativem Gewebe nach Verletzung induziert wird (Itoh et al. 2000), waren jeweils ebenfalls wesentlich stärker erhöht in Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO als von MDR1A KO.

Im Gegensatz dazu zeigten sowohl MDR1A KO- als auch TLR2/MDR1A dKO- im Vergleich zu gesunden WT-Mäusen eine ähnlich erhöhte Expression der Proteine Galectin-1, ein Hauptregulator verschiedener T-Zell-Antworten, und der antiinflammatorischen Moleküle IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) und IL-4.

Zusammengefasst führte der Verlust von TLR2 in MDR1A-defizientem Kontext zu einer frühen Hochregulation an verschiedenen proinflammatorischen und apoptotischen Mediatoren auf Proteinebene im Colon.

Tabelle 3.2 Proteinexpressionsanalyse von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren im Colon von 5 Wochen alten Mäusen.

Proteinlysate aus dem mittleren Colon von 5 Wochen alten WT-, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurde mittels "Protein-Array-Analyse" auf die Expression von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren untersucht, wie in *Material und Methoden* beschrieben. Die Tabelle zählt diejenigen Proteine auf, die mindestens 2,0-fach im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen hochreguliert waren (n=2 pro Genotyp).

Protein-expressions-analyse	MDR1A KO	TLR2/MDR1A dKO	
IL-12p40	1.28	5.85	Th1-Polarisierung
IL-12p70	1.56	3.36	
sTNFRI	2.83	15.22	
Fcγ RIIB	2.04	11.32	
FasL	1.07	6.32	Apoptose
Gas 6	4.40	9.30	
Granzyme B	2.16	20.03	
CCL3	2.01	7.77	Chemokine
CCL20	1.56	4.99	
CCL22	2.62	5.80	
CXCL16	2.23	5.72	
SPINT1	9.68	33.47	Gewebsschädigung
Galectin-1	2.86	3.60	Anti-inflammatorisch
IL-1ra	4.95	6.03	
IL-4	1.84	2.38	

3.3.8 Basal-Sekretion von Zyto- und Chemokinen in isolierten Pan-T-Lymphozyten aus der Lamina Propria des Colons

Um die Lymphozyten aus der intestinalen LP funktional näher zu charakterisieren, wurden LP-Zellen aus dem Colon von MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen isoliert. Pan-T-Zellen wurden mit Hilfe von negativer magnetischer Selektion angereichert und für 72h (ohne Zusatz von T-Zell-stimulierenden Faktoren) kultiviert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen auf die Proteinexpression von 62 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen mittels "Protein-Array" analysiert (Tabelle 3.3). Dabei zeigten TLR2/MDR1A dKO-T-Zellen eine erhöhte basale Sekretion von IL-12 im Vergleich zu MDR1A KO-T-Zellen. Ebenfalls im basalen Zustand erhöht in TLR2/MDR1A dKO-T-Zellen waren verschiedene Chemokine (CCL1, CCL12, CCL17, CCL19, CCL25, CCL27, CXCL3, CXCL4). Des Weiteren waren Zytokine

(XCL1, CSF1), die bei der Rekrutierung und Differenzierung von Immunzellen eine Rolle spielen, in TLR2/MDR1A dKO-T-Zellen im Vergleich zu MDR1A KO-T-Zellen erhöht.

Diese Daten legen nahe, dass der TLR2-Verlust in MDR1A-defizienten T-Zellen aus dem Colon zu einem deutlich erhöhten basalen Aktivierungszustand im Vergleich zu T-Zellen von MDR1A KO-Mäusen führt.

Tabelle 3.3 Proteinexpressionsanalyse von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren in Lymphozyten aus der intestinalen Lamina Propria.

Pan-T-Lymphozyten aus der intestinalen LP von MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben, mit Hilfe von negativer magnetischer Selektion isoliert und für 72h kultiviert. Überstände der Zellen wurden mittels „Protein-Array-Analyse“ auf die Expression von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren untersucht. Die Tabelle zählt diejenigen Proteine auf, die in TLR2/MDR1A dKO- mindestens 1,9-fach im Vergleich zu MDR1A KO-T-Zellen hochreguliert waren (Zellen von n=4 pro Genotyp wurden gepooled). Zellen wurden im Triplikat kultiviert und „Protein-Array-Analyse“ wurde im Duplikat durchgeführt. ns: nicht signifikant.

	TLR2/MDR1A dKO
	Durchschnittlicher Unterschied in der Proteinexpression relativ zu MDR1A KO
CCL1	1.90
CCL2	ns
CCL12	2.64
CCL17	2.42
CCL19	2.84
CCL25	2.26
CCL27	3.87
CSF1	1.93
CXCL3	2.21
CXCL4	3.42
CXCL6	ns
XCL1	2.02
CD62	2.33
IGFBP3	3.80
IL12-p70	2.30

3.3.9 ZO-1-assoziierte Integrität der intestinalen epithelialen Barriere

MDR1A-defiziente Colitis geht mit einer Zerstörung der intestinalen Mukosabarriere einher (Panwala et al. 1998; Resta-Lenert et al. 2005; Collett et al. 2008).

Um zu untersuchen, ob bereits im frühen Alter vor Anzeichen einer Colitis, Defekte in der *“tight junction”* Barriere bestehen, wurden Gefrierschnitte des distalen Colons von 5 Wochen alten WT, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen, die alle einen niedrigen Histologie-“Score” aufwiesen ($\leq 2,5$), mit Immunfluoreszenzfärbung auf die Expression des *“tight junction”*-Proteins ZO-1 untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von CD4 untersucht, um eine mögliche Korrelation zwischen Barrieredefekten und T-Zell-Infiltraten zu analysieren. Keiner der untersuchten Genotypen wies Störungen in der ZO-1-Expression auf. Auch TLR2/MDR1A dKO-Mäuse, die bereits vereinzelte CD4+-Zellinfiltrate aufwiesen, hatten eine intakte ZO-1-Barriere.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass zumindest primär kein initialer Defekt der *“tight junction”*-assoziierten Barriereintegrität vorlag.

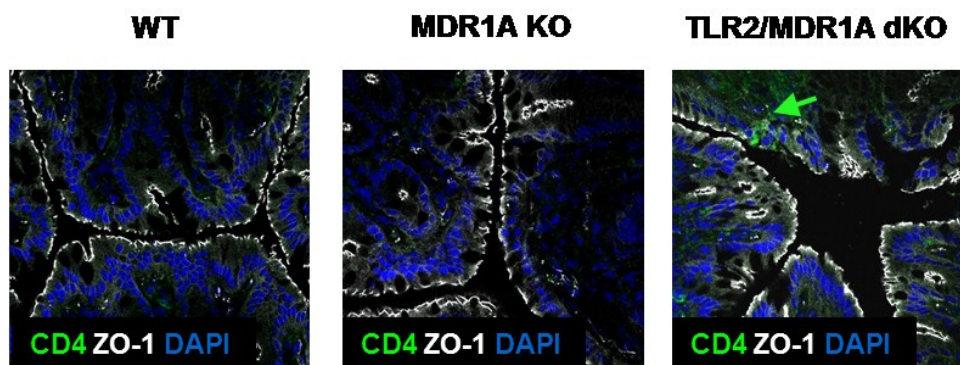


Abb. 3.12 *“Tight junction”*-Integrität in gesunden WT, MDR1A KO und TLR2/MDR1A dKO.

Gefrierschnitte des distalen Colons von 5 Wochen alten WT-, MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mit vergleichbar niedrigem Histologie-“Score” wurden auf die Anwesenheit von T-Zellen und Integrität der *“tight junction”*-Barriere untersucht. T-Zellen und *“tight junctions”* wurden mit Immunfluoreszenzfärbung durch Inkubation mit anti-CD4 Antikörper (FITC: grün) und anti-ZO-1 Antikörper (Cy5: weiß) charakterisiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. (Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Der grüne Pfeil deutet auf vereinzelte CD4+ Zellen hin. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Genotyp. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.3.10 IL-1 β -Proteinproduktion in der Lamina Propria des Colons

3.3.10.1 Morphologie von IL-1 β -produzierenden Zellen

Die Analyse per Real-Time qRT-PCR hatte einen frühzeitigen Anstieg von IL-1 β -mRNA im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen gezeigt (Abb. 3.10). Dies sollte im nächsten Schritt mit spezifischer Immunfluoreszenzfärbung gegen IL-1 β auf Proteinebene bestätigt werden. Wie in Abb. 3.13 gezeigt, wiesen nur TLR2/MDR1A dKO-Mäuse bereits im Alter von 5 Wochen vereinzelte IL-1 β ⁺-Zellen in der LP des Colons auf (Abb. 3.13 A). Dies war nicht in den anderen Genotypen erkennbar. IL-1 β -Protein war hierbei nicht nur intra- sondern auch extrazellulär zu detektieren, welches für eine Sekretion des Zytokins spricht. IL-1 β -Produktion war nur in Immunzellen der LP, nicht in IECs, zu beobachten. IL-1 β ⁺-LPMNCs expandierten mit dem Alter, so dass 10 Wochen alte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse große IL-1 β ⁺-Areale im Colon zeigten (Abb. 3.13 B). Die LP von MDR1A KO-Mäusen hingegen wies nur vereinzelte IL-1 β ⁺-Zellen im Alter von 10 Wochen auf. Alle anderen Genotypen zeigten auch zu diesem späteren Zeitpunkt keine IL-1 β -Proteinproduktion im Colon.

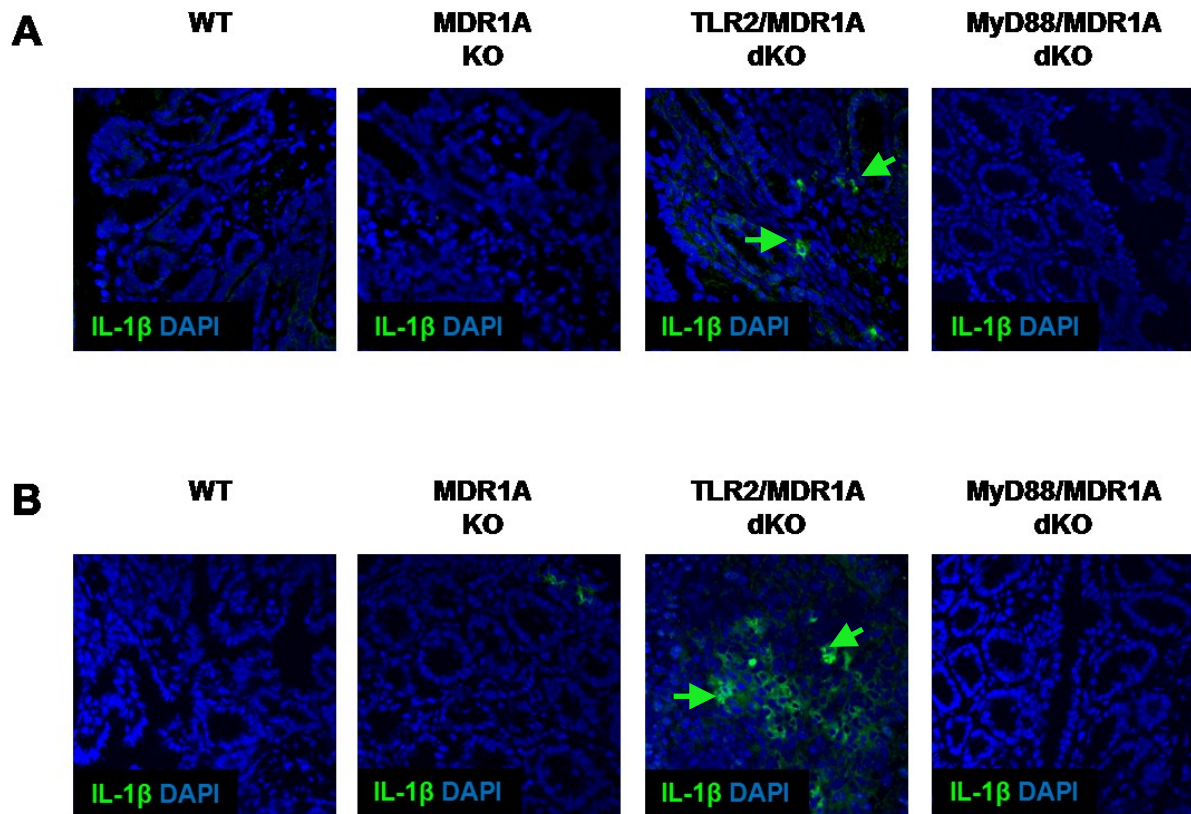


Abb. 3.13 IL-1 β -Proteinproduktion im Colon der verschiedenen Mausstämmen.

Die Verteilung von IL-1 β -LP-Zellen (FITC: grün) im distalen Colon von 5 Wochen (A) und 10 Wochen (B) alten WT-, MDR1A KO-, TLR2/MDR1A dKO- und MyD88/MDR1A dKO-Mäusen wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Genotyp. Grüne Pfeile deuten auf IL-1 β -Areale hin. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.3.10.2 Identifizierung des IL-1 β -produzierenden Zelltyps

Um den Zelltyp der IL-1 β -produzierenden Zellen in der LP zu identifizieren, wurden mononukleäre Zellen aus der intestinalen LP von 12 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen isoliert und mit Hilfe von Durchflusszytometrie charakterisiert. Die technische Durchführung der Färbung und der durchflusszytometrischen Messung mit Kompensation wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. Joachim Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt, die die Rohdaten zur weiteren Analyse zur Verfügung stellten.

Ca. 6% der mononukleären Zellen in der intestinalen LP der TLR2/MDR1A dKO-Mäuse produzierten IL-1 β (Abb. 3.14). Diese Zellen waren nahezu ausschließlich

CD11b+ (>80%). Daher konnten CD11b+ Zellen als die Hauptquelle der IL-1 β -Produktion im Colon von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen identifiziert werden.

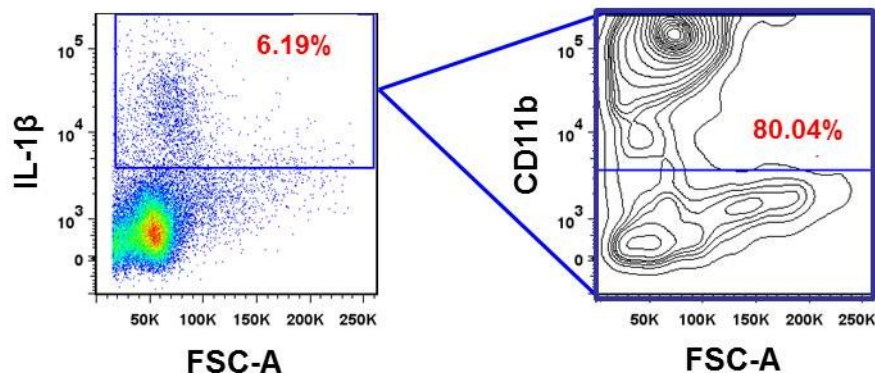


Abb. 3.14 Charakterisierung der IL-1 β -produzierenden Zellen in der intestinalen LP von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

Mononukleäre Zellen wurden aus der intestinalen LP von 12 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen, wie in *Material und Methoden* beschrieben, isoliert. Alle lebenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Expression von IL-1 β und CD11b untersucht. Alle IL-1 β + Zellen (links, blauer Kasten) wurden auf die gleichzeitige Expression von CD11b untersucht (rechts). Repräsentative Abbildungen von 4 Mäusen sind hier dargestellt.

3.3.11 Wesentliche Ergebnisse zum Phänotyp der unterschiedlichen Mausstämmen

Zusammengefasst, führte der Verlust von TLR2 in MDR1A KO-Mäusen zu einer verschlimmerten Colitis, die durch frühe Rekrutierung von Immunzellen und einer Verlagerung in Richtung Th1-vermittelter Immunantwort charakterisiert war. Die Produktion des Th1-Zytokins IL-1 β erfolgte dabei hauptsächlich durch CD11b+-Zellen.

Im Gegensatz dazu, führte der Verlust von MyD88 in MDR1A KO-Mäusen zu einer Verhinderung der Colitisentwicklung.

3.4 Rolle der kommensalen Bakterienflora in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen

Kommensale Darmbakterien können murine Spontancolitis triggern (Sellon et al. 1998). Um festzustellen, ob im Modell der TLR2/MDR1A dKO-Colitis die kommensalen Darmbakterien für die Entstehung der Colitis entscheidend sind,

wurden TLR2/MDR1A dKO-Mäuse entweder *prophylaktisch* oder *therapeutisch* mit Breitbandantibiotika (Vancomycin und Imipenem (Rath et al. 2001)) oral im Trinkwasser behandelt. Diese oral verabreichte Antibiotika-Kombination wird kaum resorbiert und wirkt daher lokal im Darmlumen. Die *prophylaktische* Behandlung begann direkt nach dem Absetzen (im Alter von 3 Wochen), wenn die Mäuse noch keine klinischen Zeichen der Colitis zeigten. Für den *therapeutischen* Versuchsansatz wurden 18 Wochen alte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse mit bereits bestehender Colitis behandelt. Beide Antibiotika-Gruppen wurden parallel mit gleichaltrigen, unbehandelten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen als Kontrollen verglichen. Die *prophylaktische* als auch die *therapeutische* Verabreichung der Breitbandantibiotika erfolgte über eine Dauer von 8 Wochen. Anschließend wurden die Mäuse getötet und Colon und Milz wurden entnommen und untersucht.

3.4.1 Klinische Parameter nach Antibiose

Zunächst wurden die Auswirkungen der beiden Antibiotika-Behandlungen auf die klinischen Parameter untersucht (Abb. 3.15). Im Vergleich zu WT-Mäusen, zeigten unbehandelte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse (ca. 11 oder 26 Wochen alt) – wie erwartet – eine deutliche Reduktion der Colonlänge (Abb. 3.15 A und C) sowie diarrhoe-typische Symptome (weicher Faeces im Darmlumen). Durch die transmurale Entzündung zeigte sich makroskopisch eine deutliche Verdickung der Darmwand. Im Gegensatz dazu zeigten die entnommenen Därme von antibiotisch-behandelten Mäusen deutliche Unterschiede. Das Colon von antibiotisch-behandelten Mäusen war makroskopisch durch eine dünne Darmwand und gleichmäßige Verteilung der geformten Faeces-Pellets gekennzeichnet (Abb. 3.15 A). Typischerweise war das Caecum unter Antibiose-Behandlung deutlich vergrößert, wie unter keimfreien Bedingungen beschrieben (Savage und Dubos 1968). Sowohl *prophylaktische* als auch *therapeutische* Antibiotikabehandlung verhinderten die Reduktion der Colonlänge signifikant (Abb. 3.15 C).

Die Milz von unbehandelten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen nahm an Größe deutlich zu (Abb. 3.15 B und D). Hingegen zeigten Mäuse, die *prophylaktisch* mit Antibiotika behandelt wurden, eine mit der WT-Gruppe vergleichbare Milzgröße. Die *therapeutische* Behandlung hingegen hatte zwar keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Milzgröße – aber es war ein Trend zu einer Reduktion des

Milzgewichtes erkennbar. Lediglich eine Maus wies eine Splenomegalie trotz therapeutischer Antibiose auf. Die Tatsache, dass dennoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde, liegt daran, dass die Stichprobenzahl mit 5 Mäusen pro Gruppe gering war.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse zeigten im Alter von 11 Wochen eine mangelnde Gewichtszunahme. *Prophylaktische* Antibiotika-Behandlung erlaubte jedoch eine altersentsprechende regelgerechte Gewichtszunahme (Abb. 3.15 E). Im Gegensatz dazu wiesen unbehandelte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse im Alter von 26 Wochen (Therapie-Kontrollgruppe), trotz fulminanter Colitis ein normales Körpergewicht auf – vergleichbar mit gesunden WT-Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Diese Gewichtszunahme im Alter war nicht auf eine Zunahme der Fettmasse zurückzuführen, sondern wurde indirekt durch die „Organomegalie“ (Colon, Milz) im Rahmen der massiven Entzündungsreaktion im fortgeschrittenen Alter verursacht. Wie in Abb. 3.15 E gezeigt, hatte die *therapeutische* Antibiotika-Behandlung keine Auswirkungen auf das Körpergewicht.

Diese Daten legten klinisch nahe, dass die *prophylaktische* Antibiotika-Behandlung die Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen verhinderte, während die *therapeutische* Antibiotika-Behandlung zu einer Verbesserung der Colitis führte.

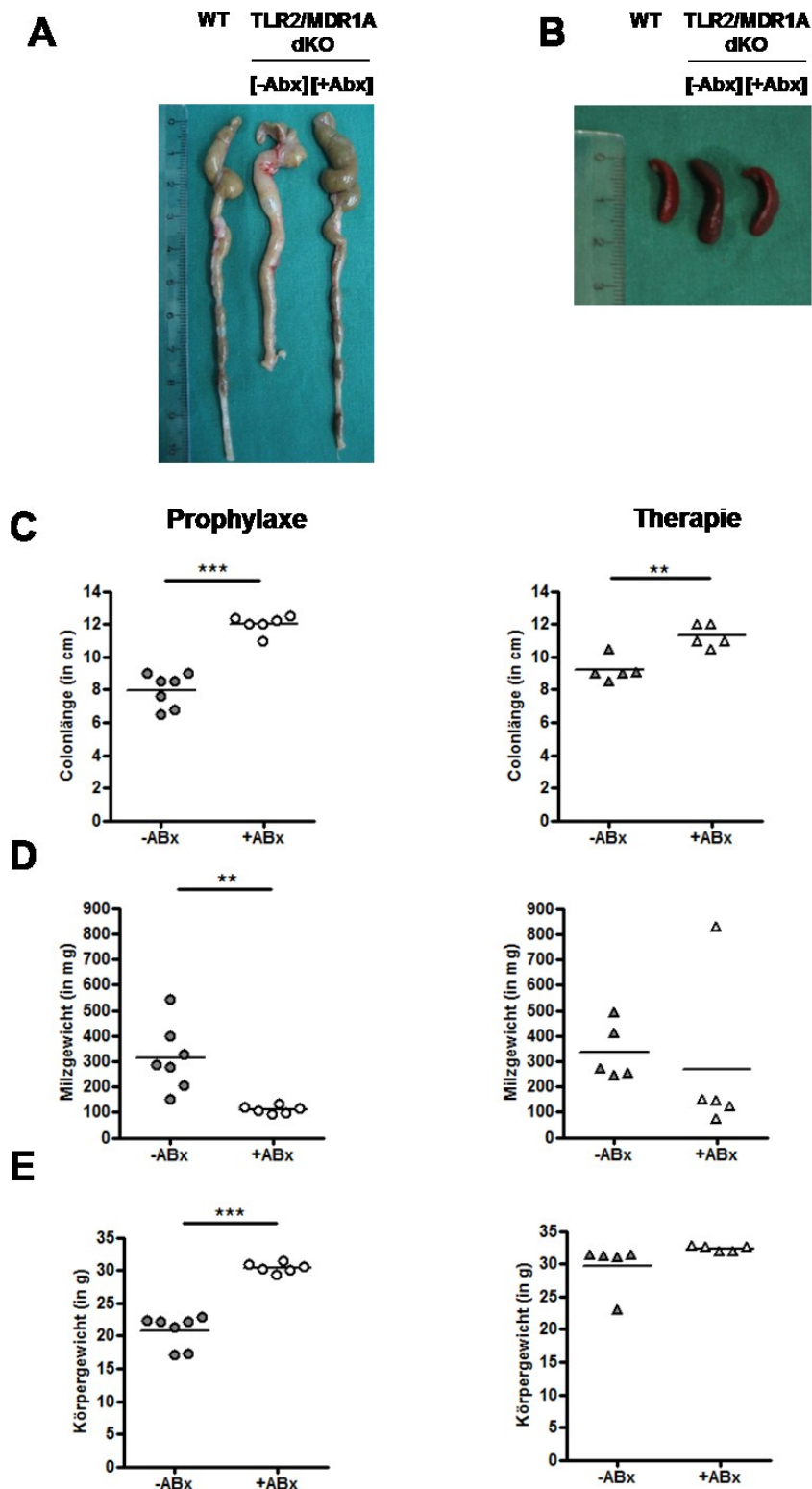


Abb. 3.15 Effekt der Antibiotika-Behandlung auf die klinischen Parameter in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse ($n \geq 5$) wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. WT-Mäuse blieben unbehandelt. Exemplarische Darstellung eines Colons (A) bzw. einer Milz (B) nach *Antibiotika-Prophylaxe* im Vergleich zu WT und unbehandelten TLR2/MDR1A dKO. Der Effekt der *prophylaktischen* und *therapeutischen* Antibiotika-Behandlung auf das Körpergewicht (C), Colonlänge (D) und Milzgewicht (E) wurde untersucht. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.2 Histopathologie des distalen Colons nach Antibiose

Als Nächstes wurden die Auswirkungen der beiden Antibiotika-Behandlungen auf das histologische Ausmaß der Entzündung im distalen Colon untersucht und miteinander verglichen. In den H&E-gefärbten Gewebeschnitten der unbehandelten Kontrolldärme zeigte sich – wie zuvor in Abb. 3.5 beschrieben – die massive Mukosaverdickung mit zahlreichen Kryptenabszessen, inflammatorischen Infiltrationen der LP sowie deutlichem Verlust an Becherzellen (Abb. 3.16 A).

Die *prophylaktische Gabe* von Antibiotika verhinderte die Colitisentwicklung auf histologischer Ebene komplett. Es zeigten sich Histologie-“Scores” im Normbereich ($1,67 \pm 0,2$) – vergleichbar mit WT-Kontrollen (Abb. 3.16 B).

Die *therapeutische Gabe* von Antibiotika milderte die Colitisentwicklung signifikant und es zeigte sich eine deutliche Besserung des mittleren Histologie-“Scores” ($4,75 \pm 0,3$) (Abb. 3.16 B). Eine vollständige Wundheilung und Regeneration der intestinalen Mukosa konnte jedoch nicht erzielt werden. Trotz Therapie zeigten sich weiterhin Residuen der inflammatorischen Infiltrate in der LP des Colons (Abb. 3.16 A, Pfeile).

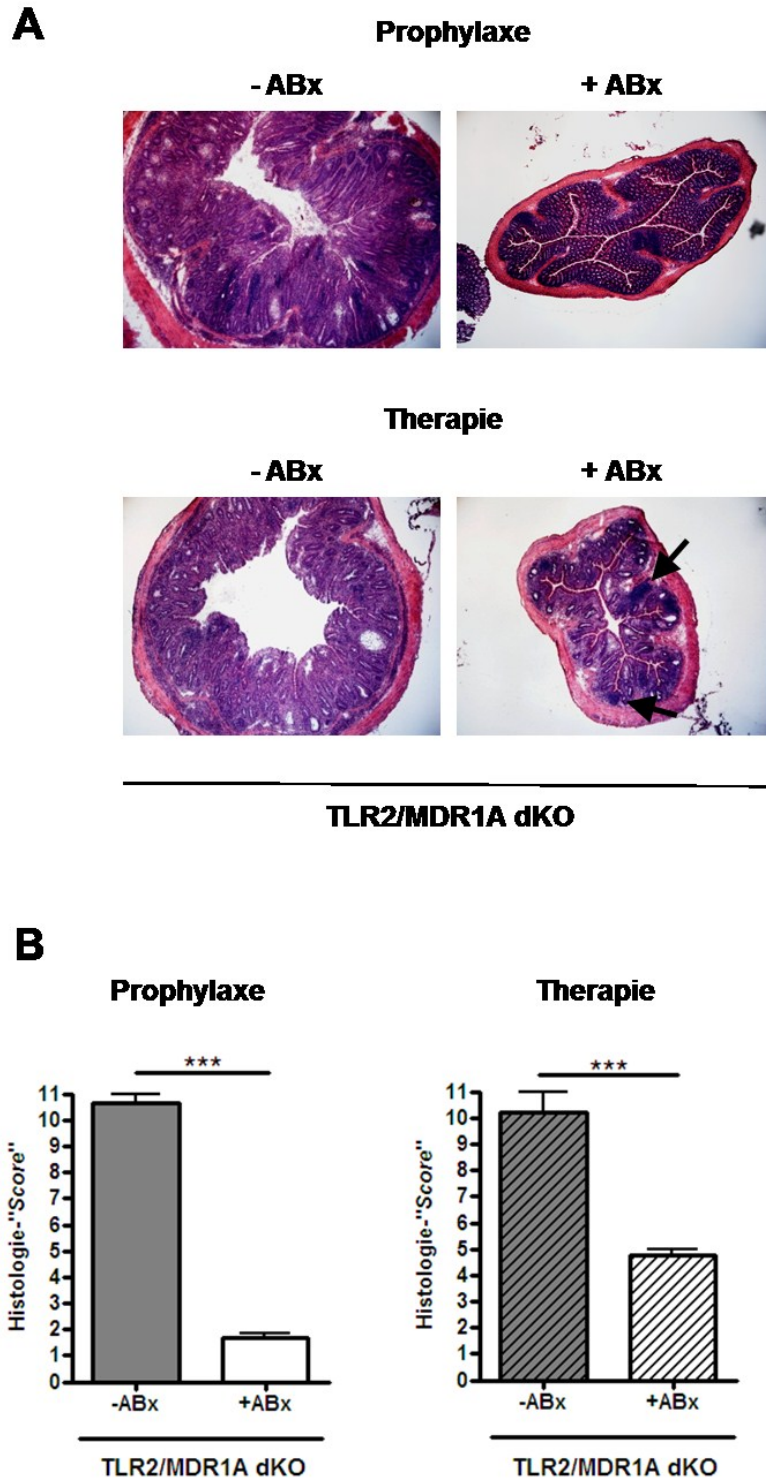


Abb. 3.16 Effekt der prophylaktischen vs. therapeutischen Antibiotika-Behandlung auf die Histopathologie des Colons in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. Der Effekt der Antibiotika-Behandlung auf die Histopathologie des Colons wurde untersucht. Gefrierschnitte vom distalen Colon von allen Gruppen wurden mit H&E angefärbt und unter dem *Nikon Eclipse E600*-Mikroskop beurteilt. Repräsentative Bilder sind für jede Gruppe gezeigt (Vergrößerung: 4x). Der schwarze Pfeil deutet auf residuale inflammatorische Infiltrate in der LP nach Antibiotika-Therapie hin (A). Der Histologie-"Score" (B) wurde anhand der Kriterien in **Tabelle 2.10** bestimmt. Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 3$ Mäuse pro Genotyp) dargestellt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.3 mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen nach Antibiose

Die Analyse der mRNA-Expression des Pan-T-Zell-Markers CD3 in TLR2/MDR1A dKO-Colons zeigte, dass die antibiotische *Prophylaxe* die Hochregulation der CD3-mRNA-Expression in der intestinalen Mukosa verhinderte (Abb. 3.17). Hingegen blieb die gesteigerte Genexpression von CD3 nach antibiotischer *Therapie* unverändert. Diese Daten bestätigten die Persistenz residualer inflammatorischer Infiltrate trotz *therapeutischer* Antibiotika-Behandlung, die bereits in der H&E-Färbung zu sehen waren (Abb. 3.16 A, Pfeile).

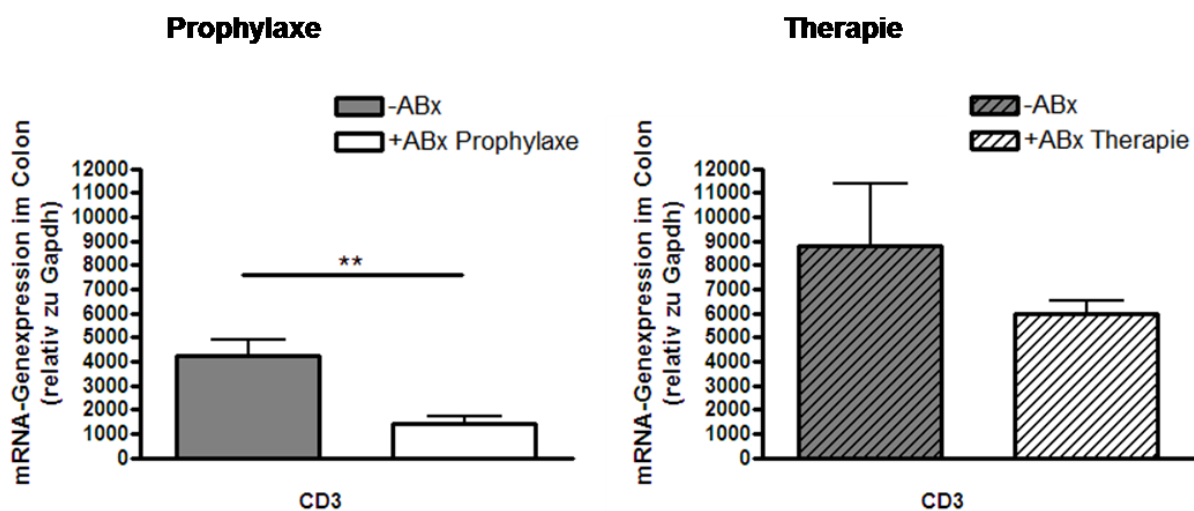


Abb. 3.17 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die mRNA-Genexpression von CD3 in TLR2/MDR1A dKO-Colon.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die Expression von CD3 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CD3 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 5$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Als Nächstes wurden die Effekte der *prophylaktischen* bzw. *therapeutischen* Antibiotika-Behandlung auf die Th1-Polarisierung in der intestinalen Mukosa des Colons von TLR2/MDR1A dKO mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Colongewebe von unbehandelten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zeigten erhöhte Genexpressionen von IL-1 β -, IL-12-, IFN- γ -, IL-2- und TNF- α -mRNA (entsprechend zu Abb. 3.10). Die *Antibiotika-Prophylaxe* verhinderte allerdings den Anstieg dieser Th1-Zytokine vollständig (Abb. 3.18 A). Hingegen führte die *Antibiotika-Therapie* zu

einer signifikanten Herunterregulation von lediglich IL-1 β - und TNF- α -mRNA. Die Expression von IFN- γ -mRNA zeigte einen Trend zur Herunterregulation, dies war aber statistisch nicht signifikant. Weiterhin erhöht, trotz Eliminierung der kommensalen Bakterien durch *therapeutische* Antibiotika-Behandlung, blieb außerdem die mRNA-Genexpression der Th-1-Zytokine IL-2 und IL-12.

Die Regulation der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 sowie der Th17-Zytokine IL-23r, IL-17, IL-21 und IL-27 auf mRNA Ebene blieb durch die *prophylaktische* als auch durch die *therapeutische* Antibiotika-Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen ebenfalls weitgehend unbeeinflusst (Abb. 3.18 B und C).

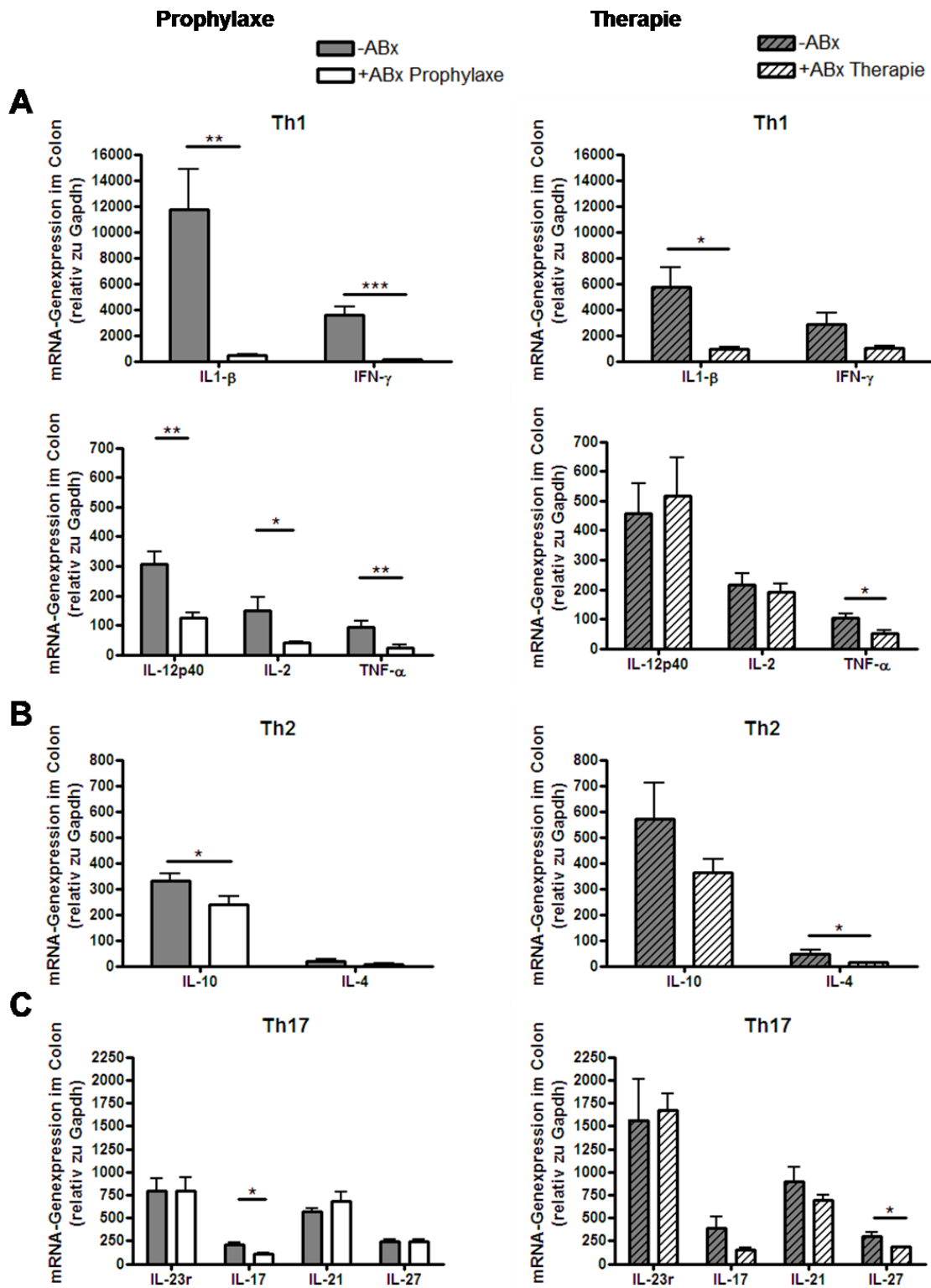


Abb. 3.18 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Th1-Polarisierung im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die mRNA-Genexpression von Th1- (A), Th2- (B) und Th17- (C) Zytokinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen der Th1/Th2/Th17-Zytokine wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 5$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Analyse der Genexpression des Chemokins CCL2 zeigte, dass die unbehandelten TLR2/MDR1A dKO-Gruppen eine hohe CCL2-mRNA-Expression aufwiesen. Die *prophylaktische* Antibiotika-Behandlung verhinderte diese erhöhte Chemokin-Expression im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen komplett (Abb. 3.19). Auch die *therapeutische* Behandlung führte zu einer deutlich verringerten CCL2-mRNA-Genexpression, dies war statistisch jedoch nicht signifikant.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass die *prophylaktische* Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mit Breitbandantibiotika die Th1-Polarisierung im Colongewebe auf mRNA-Ebene verhinderte. Die *therapeutische* Antibiotika-Behandlung hingegen milderte den Colitisverlauf ab, mit nur teilweiser Reduktion und Umkehrbarkeit der Th1-Polarisierung.

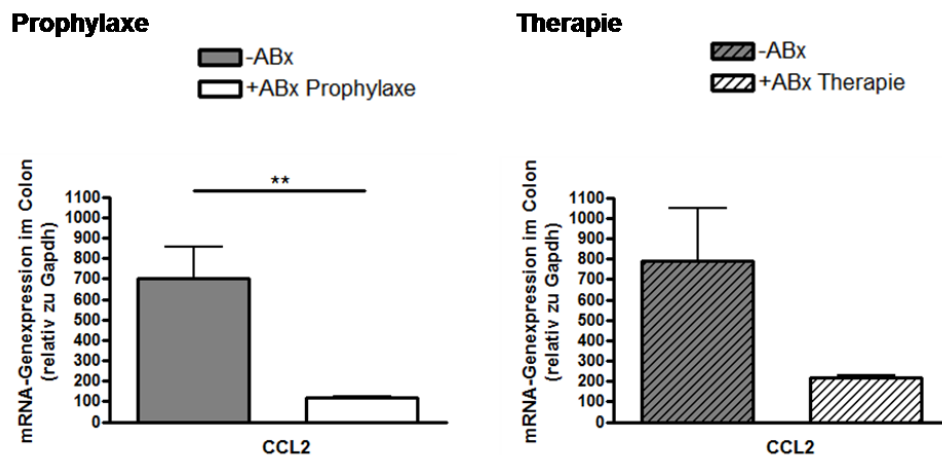


Abb. 3.19 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die mRNA-Genexpression von CCL2 im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die mRNA-Genexpression von CCL2 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CCL2 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 5$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.4 Effekte von Antibiose auf die Rekrutierung von CD11b+-Zellen und IL-1 β -Produktion

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Modulation der Colitisentwicklung durch die beiden Antibiose-Behandlungen Auswirkungen auf die Rekrutierung von CD11b+-Zellen in die LP und deren IL-1 β -Produktion hat. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass unbehandelte TLR2/MDR1A dKO-Kontrollmäuse große Aggregate an CD11b+-Zellen und IL-1 β +-Arealen in der intestinalen LP aufwiesen (Abb. 3.20). *Prophylaktische* Gabe von Antibiotika verhinderte die Rekrutierung von CD11b+-Zellen und IL-1 β -Produktion vollständig (Abb. 3.20 A). Sehr vereinzelte CD11b+-Zellen blieben jedoch noch weiterhin in der LP von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen nach *therapeutischer* Gabe von Antibiotika vorhanden. Es war aber keine IL-1 β -Produktion mehr nachweisbar (Abb. 3.20 B).

Diese Daten zeigten, dass *prophylaktische* und *therapeutische* Antibiose die Infiltration von CD11b+-Zellen und deren IL-1 β -Produktion effektiv verhindern konnten.

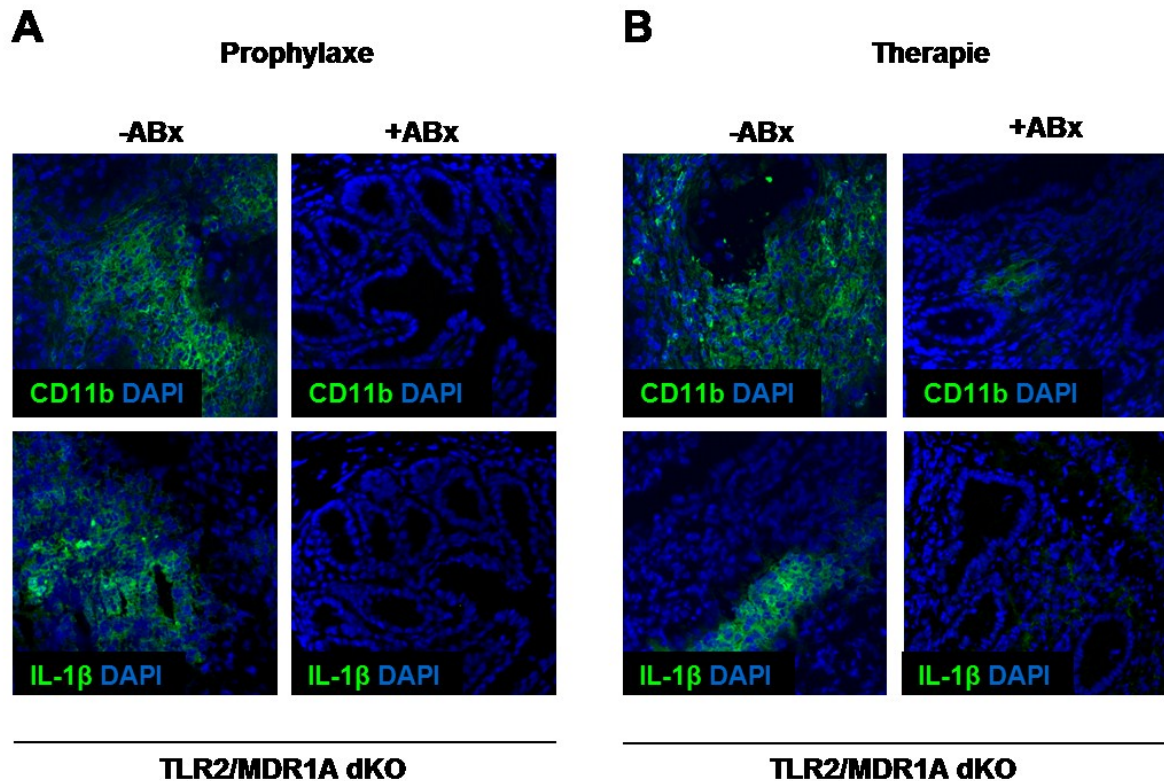


Abb. 3.20 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Rekrutierung von CD11b⁺- und IL-1 β ⁺-Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. Die Auswirkungen von *prophylaktischer* (A) und *therapeutischer* (B) Antibiotikabehandlung auf die Verteilung von CD11b⁺- und IL-1 β ⁺-Zellen (FITC: grün) im distalen Colon von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Gruppe. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.4.5 Effekte von Antibiose auf die Rekrutierung von CD4⁺-Zellen

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Modulation der Colitisentwicklung durch die beiden Antibiose-Behandlungen Auswirkungen auf die Rekrutierung von CD4⁺-Zellen in die LP hat. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass unbehandelte TLR2/MDR1A dKO-Kontrollmäuse massive Infiltration der LP durch CD4⁺-Zellen aufwiesen (Abb. 3.21 A und B). *Prophylaktische* Gabe von Antibiotika verhinderte die Rekrutierung von CD4⁺-Zellen vollständig (Abb. 3.21 A). Im Gegensatz dazu hatte die *therapeutische* Gabe von Antibiotika keine Auswirkungen auf die Rekrutierung von CD4⁺-Zellen (Abb. 3.21 B). Trotz *therapeutischer* Behandlung waren weiterhin zahlreiche CD4⁺-Zellen in der LP der TLR2/MDR1A dKO zu finden, welches die

residualen Infiltrate bestätigt, die bereits in der H&E-Färbung zu sehen waren (Abb. 3.16 A).

Diese Daten zeigten, dass die *prophylaktische* – nicht aber die *therapeutische* Antibiose – die Infiltration von CD4+-Zellen verhindern konnte.

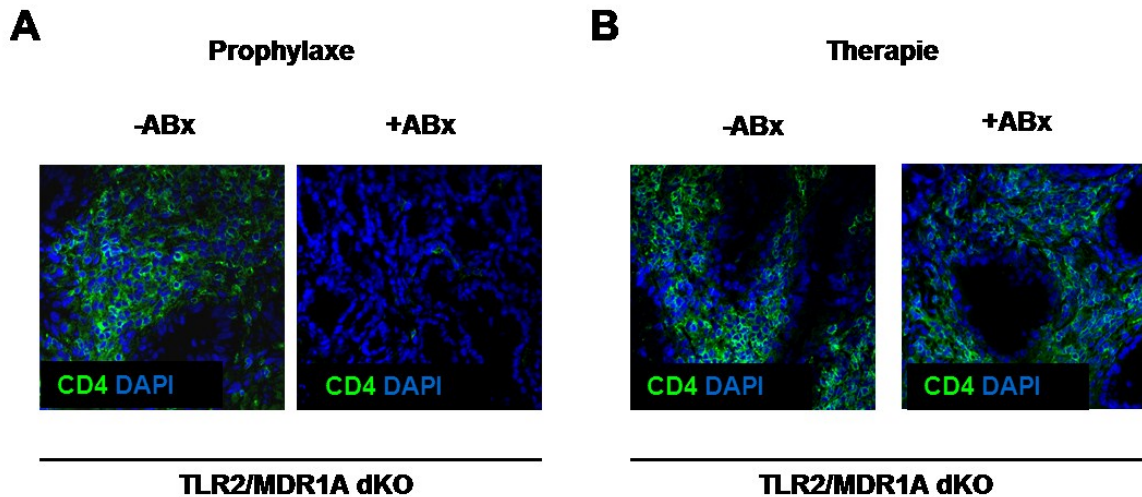


Abb. 3.21 Auswirkungen der Antibiotika-Behandlung auf die Rekrutierung von CD4+-Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen (*Prophylaxe*) bzw. 18 Wochen (*Therapie*) jeweils für 8 Wochen mit (+) oder ohne (-) Breitbandantibiotika (ABx) behandelt. Die Auswirkungen von *prophylaktischer* (A) und *therapeutischer* (B) Antibiotikabehandlung auf die Verteilung von CD4+-Zellen (FITC: grün) im distalen Colon von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Gruppe. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.4.6 Wesentliche Ergebnisse zur Rolle der kommensalen Bakterienflora

Zusammengefasst verhinderte die *prophylaktische* Antibiotika-Behandlung die Colitisentwicklung mit der damit verbundenen Th-1-Polarisierung und Rekrutierung von Immunzellen bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen vollständig. Die *therapeutische* Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mit Antibiotika milderte die Colitis signifikant ab und verhinderte teilweise die Produktion von Th1-Zytokinen. Dennoch blieben aber zahlreiche CD4+-inflammatorische Infiltrate weiterhin in der LP des Colons vorhanden und einige Zytokine blieben trotz Behandlung erhöht.

3.5 Funktionelle Rolle der CD11b⁺-Zellen in der Colitisprogression in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen

Da die Verschlimmerung der Colitis, die Rekrutierung von CD11b⁺ Zellen und deren IL-1 β -Produktion kommensal-abhängig zu sein schienen, wurde als Nächstes untersucht, inwieweit der Verlust von TLR2 die Funktionalität von CD11b⁺-Zellen gegenüber Kommensalen beeinflussen könnte.

CD11b wird von myeloischen Zellen, u.a. von Makrophagen, exprimiert. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem beim Erkennen und Beseitigen von pathogenen Bakterien. Makrophagen können Pathogene durch Phagocytose entfernen oder andere Immunzellen durch die Sekretion von Zytokinen zu Reaktionen stimulieren.

Da gezeigt wurde, dass CD11b⁺-Zellen vermehrt IL-1 β produzieren (Abb. 3.14), wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob Makrophagen eine veränderte inflammatorische Antwort über den IL-1 β -Signalweg auf Lipopolysaccharid (LPS) – als Hauptbestandteil Gram-negativer *E.coli* – zeigen. Da das Peritoneum eine hohe Anzahl an Makrophagen beherbergt und diese leicht zu isolieren sind, wurden Peritoneal-Makrophagen zur funktionellen Analyse verwendet. Hierfür wurden Peritoneal-Makrophagen von 5 Wochen alten MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mit einer „Lavage“ isoliert und für 20h mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Nach 20h Inkubation wurden die adhärenenten Zellen analysiert. Wie in Abb. 3.22 A und B gezeigt, waren nahezu alle adhärenenten Zellen CD11b⁺. Nur vereinzelte CD11b⁻ Zellen waren noch in der Kultur vorhanden (Abb. 3.22 B, weiße Pfeile). In einigen CD11b⁺-Zellen waren kleine „bläschenartige“ Strukturen (Abb. 3.22 B, grüner Pfeil), wahrscheinlich Phagosomen, zu erkennen.

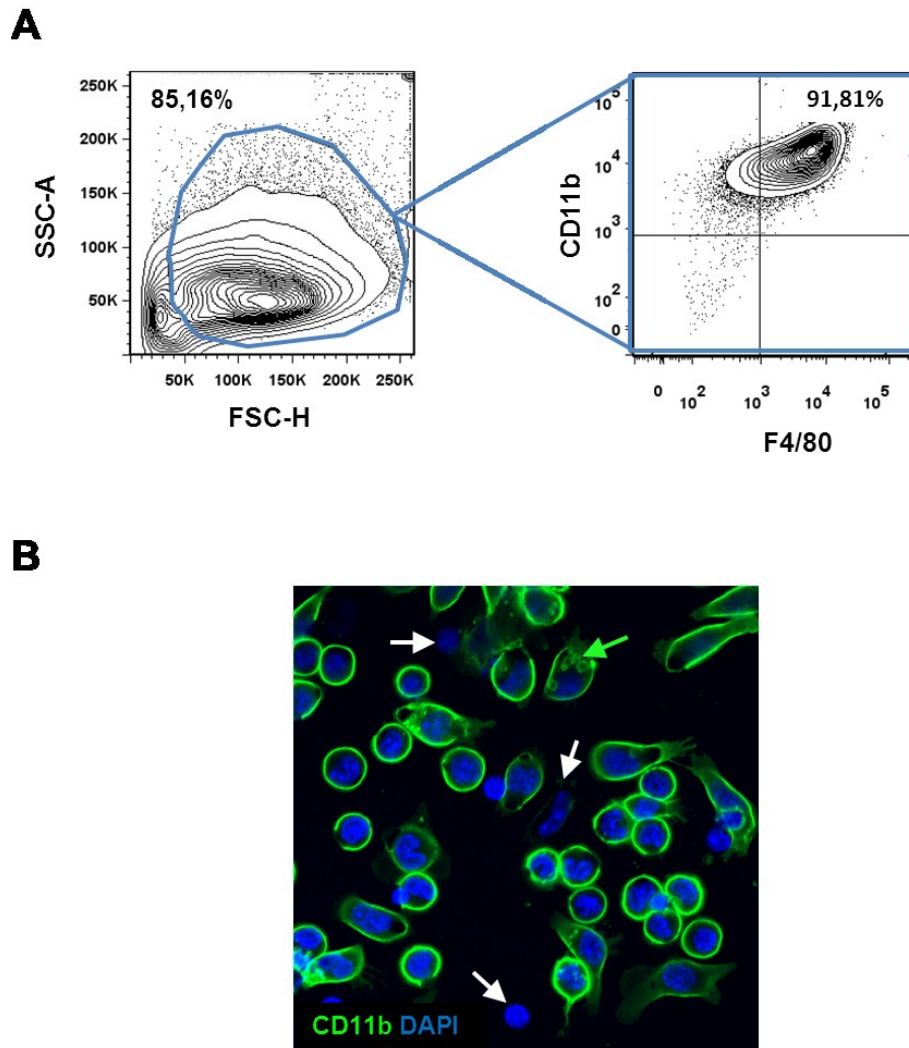


Abb. 3.22 CD11b-Expression von adhärennten Peritoneal-Zellen.

Peritoneal-Makrophagen wurden, wie in *Material und Methoden* beschrieben, isoliert und für 20h kultiviert. Die Expression von CD11b und F4/80 wurde mittels Durchflusszytometrie (A) bestimmt. Abgebildet ist eine exemplarische Messung der Peritoneal-Zellen einer MDR1A KO-Maus. Die Morphologie der CD11b⁺-Zellen wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 63x/1,4, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510) (B). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Der grüne Pfeil deutet auf Phagosomen, die weißen Pfeile auf CD11b-negative Zellen hin. Abgebildet ist eine exemplarische Färbung der Peritoneal-Zellen einer MDR1A/TLR2 dKO-Maus. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Die inflammatorische Antwort der adhärennten Makrophagen wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.23). TLR2/MDR1A dKO-Makrophagen zeigten im Vergleich zu MDR1A KO-Makrophagen eine Hyperreaktivität auf die LPS-Stimulation, welche durch eine stark erhöhte Proteinproduktion an pro-IL-1 β und "mature" IL-1 β gekennzeichnet war. Die "mature" Form von IL-1 β war nach LPS-Stimulation in beiden Genotypen sichtbar, jedoch wesentlich stärker exprimiert in den stimulierten TLR2/MDR1A dKO- als in den MDR1A KO-Makrophagen.

Das Inflammasom ist ein Proteinkomplex, der eine Kaskade an Proteinspaltungen und Aktivierung von Enzymen initialisiert, welches schließlich in der Spaltung von pro-IL-1 β endet. Dieses wird dadurch in die reife/aktive Form umgewandelt (Martinon et al. 2002). Die beiden Isoformen des NLRP3-Proteins, ein Marker für das Inflammasom, waren in den LPS-stimulierten TLR2/MDR1A dKO- im Vergleich zu MDR1A KO- und unstimulierten TLR2/MDR1A dKO-Makrophagen entsprechend erhöht.

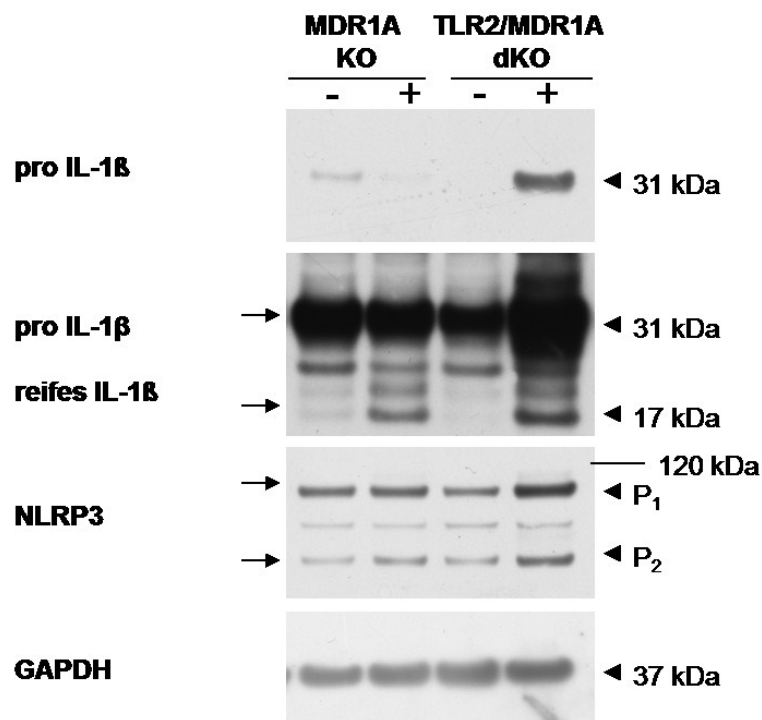


Abb. 3.23 Western-Blot-Analyse von LPS-stimulierten MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Peritoneal-Makrophagen.

Peritoneale Makrophagen wurden, wie in *Material und Methoden* beschrieben, isoliert. Zur Untersuchung der Inflammasom-Antwort der Peritoneal-Makrophagen wurden die Zellen für 20h mit LPS stimuliert und anschließend auf die Protein-Expression von IL-1 β und NLRP3 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. "Reproben" des Blots mit anti-Gapdh diente als Ladungskontrolle. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot von zwei unabhängigen Versuchen.

Zusammengefasst reagierten CD11b⁺-Peritoneal-Makrophagen von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen gegenüber LPS mit übermäßiger Produktion von IL-1 β .

3.6 Rolle des IL-1 β -Signalweges via MyD88 in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen

Wie gezeigt, ging die massive Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen frühzeitig mit einer erhöhten Produktion an IL-1 β -mRNA und Protein einher.

Die Verhinderung der Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen durch Prophylaxe mit Antibiotika war mit einer Hemmung der IL-1 β -Produktion im Colongewebe assoziiert.

IL-1 β bindet an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) (Dinarello 2011) und IL-1R signalisiert durch das Adapterprotein MyD88. Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, hemmte die Deletion von MyD88 die Colitisentwicklung bei MDR1A-Defizienz.

Um die Rolle des IL-1R-Signalweges via MyD88 in der Colitispathogenese von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zu untersuchen, wurde 1. der IL-1R pharmakologisch inhibiert bzw. 2. MyD88 genetisch deletiert. 5 Wochen alte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt.

Zu 1. Anakinra neutralisiert das IL-1 β -Signal, indem es mit endogenem IL-1 β und endogenem IL-1R-Antagonist um den IL-1R konkurriert (Cohen et al. 2002; Rubbert-Roth und Perniok 2003). Als Kontrollgruppe wurden gleichaltrige TLR2/MDR1A dKO-Mäuse eingesetzt, die lediglich mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt wurden.

Zu 2. Es wurden Triple-knockout (tKO)-Mäuse erzeugt, die defizient für TLR2, MDR1A und MyD88 waren.

3.6.1 Klinische Parameter nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88

Es wurden die Auswirkungen der Blockade von IL-1R bzw. MyD88 auf die klinischen Parameter der Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen untersucht. Weder die Anakinra-Behandlung noch die TLR2/MyD88/MDR1A Triple-Defizienz modulierten das Körpergewicht im Vergleich zu Kontroll-TLR2/MDR1A dKO (Abb. 3.24 A).

Im Gegensatz dazu, verhinderten sowohl die Behandlung mit dem IL-1R-Antagonisten als auch die genetische Defizienz von MyD88 in TLR2/MDR1A dKO-

Mäusen die Reduktion der Colonlänge sowie die diarrhoe-typischen Symptome (weicher Faeces im Darmlumen). Beide Gruppen hatten ein signifikant längeres Colon als Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse (Abb. 3.24 B).

Anakinra-behandelte TLR2/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäuse wiesen einen Trend zur Verkleinerung der Milz auf, der jedoch aufgrund der Streuung in der Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Gruppe statistisch nicht signifikant war (Abb. 3.24 C). Während 71% der Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse eine Splenomegalie zeigten, hatten lediglich 13% der TLR2/MDR1A dKO-Mäuse nach Behandlung mit Anakinra eine vergrößerte Milz. Keine der untersuchten TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäuse wies eine Splenomegalie auf.

Zusammengefasst zeigten sowohl Anakinra-behandelte TLR2/MDR1A dKO-Mäuse, als auch TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäuse eine deutliche Besserung colitis-assoziierten klinischer Parameter (Colonlänge und Milzgröße).

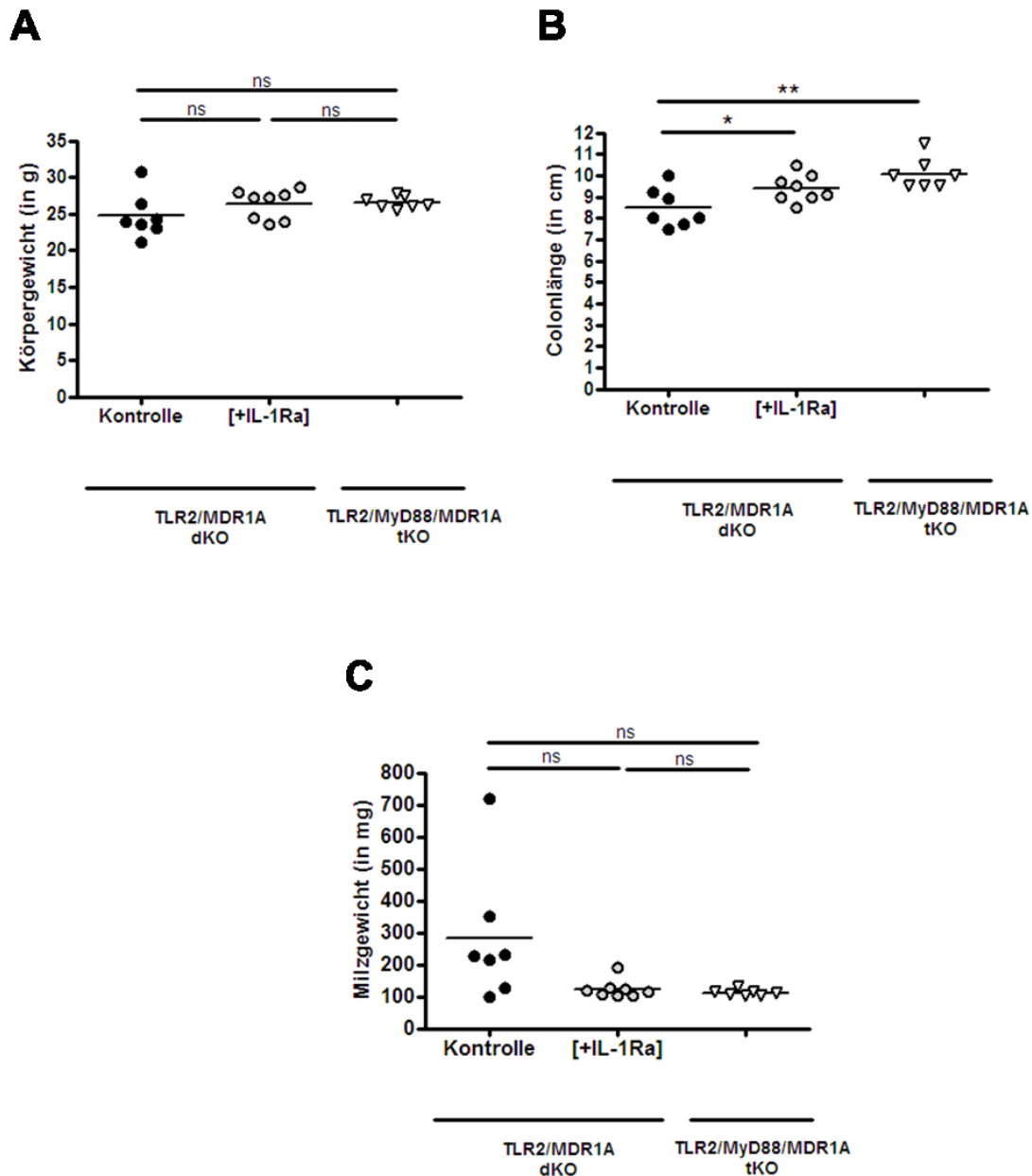


Abb. 3.24 Effekte der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die klinischen Parameter in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse ($n \geq 7$) wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die genetisch triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. Die Effekte der Anakinra-Behandlung und der Triple-Defizienz auf das Körpergewicht (A), Colonlänge (B) und Milzgewicht (C) wurden untersucht. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: nicht signifikant.

3.6.2 Histopathologie des Colons nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88

Als Nächstes wurden die Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und der TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz auf das histologische Ausmaß der Entzündung im distalen Colon untersucht und miteinander verglichen. In den H&E-gefärbten Darmgewebeschnitten der 10 Wochen alten NaCl-behandelten TLR2/MDR1A dKO-Kontrollen zeigte sich – wie zuvor in Abb. 3.5 beschrieben - die massive Mukosaverdickung mit zahlreichen Kryptenabszessen, inflammatorischen Infiltrationen der LP sowie deutlichem Verlust an Becherzellen (Abb. 3.25 A). Entsprechend war der Histologie-“Score” erhöht (9.50 ± 1.2) (Abb. 3.25 B). Die Anakinra-Behandlung milderte die Colitisentwicklung in der Mehrzahl der TLR2/MDR1A dKO-Mäuse jedoch signifikant ab, welches zu einem deutlich niedrigeren mittleren Histologie-“Score” (4.38 ± 1.1) führte (Abb. 3.25 B). Trotz Behandlung mit dem IL-1R-Antagonisten blieben jedoch weiterhin einige Immuninfiltrate in der LP des Colons nachweisbar (Abb. 3.25 A).

Im Gegensatz dazu, verhinderte die TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz die Colitisentwicklung komplett. Es waren keine histologischen Anzeichen einer Colitis sichtbar (Abb. 3.25 A) und der Histologie-“Score” von TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen (1.33 ± 0.2) war vergleichbar mit WT-Kontrollen (Abb. 3.25 B).

Zusammengefasst führte die pharmakologische Blockade des IL-1R (Anakinra) in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zu einer Milderung der Colitis, während die Deletion von MyD88 (TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz), zu einer kompletten Verhinderung der Colitisentwicklung führte.

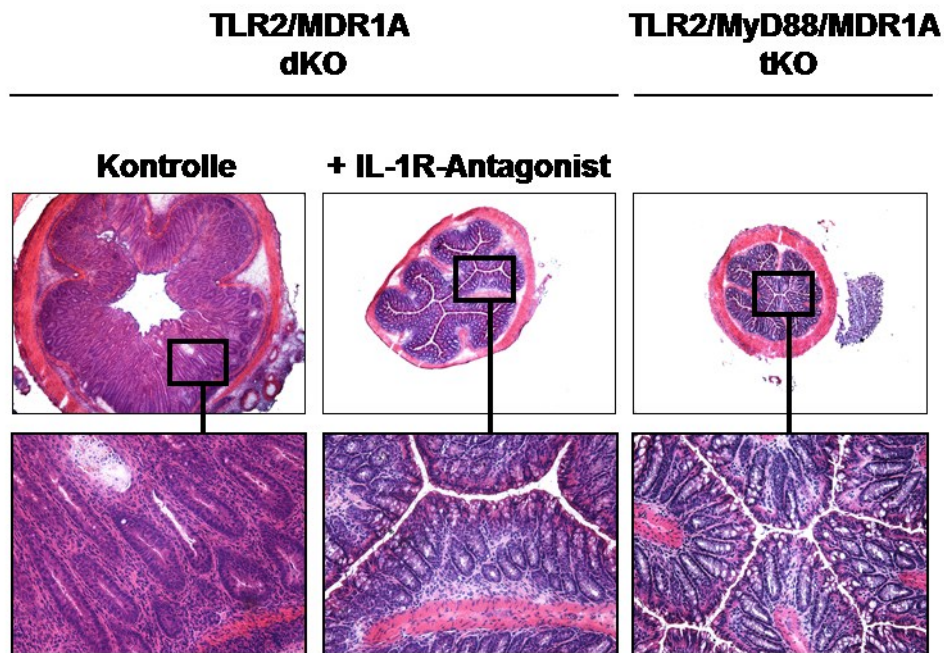
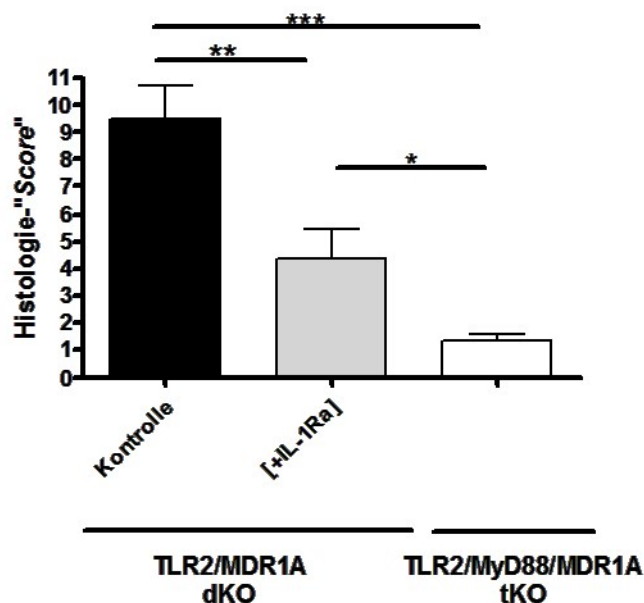
A**B**

Abb. 3.25 Effekte der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Histopathologie des Colons von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonomischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. Der Effekt der Anakinra-Behandlung und TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz auf die Histopathologie des Colons wurde untersucht. Gefrierschnitte vom distalen Colon von allen Gruppen wurden mit H&E angefärbt und unter dem *Nikon Eclipse E600-Mikroskop* beurteilt. Repräsentative Bilder sind für jede Gruppe gezeigt (Vergrößerung: obere Reihe 4x, untere Reihe 20x) (A). Der Histologie-„Score“ (B) wurde anhand der Kriterien in **Tabelle 2.10** bestimmt. Daten sind als Mittelwert \pm SEM ($n \geq 6$ Mäuse pro Gruppe) dargestellt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.6.3 mRNA-Genexpression von Th1/Th2/Th17-Zytokinen nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88

Im nächsten Schritt wurden die Effekte der Anakinra-Behandlung und TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz auf die Expansion von T-Zellen und die Th1-Immunantwort auf mRNA-Ebene untersucht.

Die Analyse der mRNA-Expression des Pan-T-Zell-Markers CD3 zeigte, dass sowohl die Anakinra-Behandlung als auch die genetische Deletion von MyD88 die Hochregulation der CD3-mRNA-Expression in der intestinalen Mukosa bei TLR2/MDR1A Doppel-Defizienz verhinderte (Abb. 3.26). Diese Daten deuteten darauf hin, dass die residualen Infiltrate in den Anakinra-behandelten Mäusen – wie in Abb. 3.25 B zu sehen - möglicherweise keine T-Zellen waren.

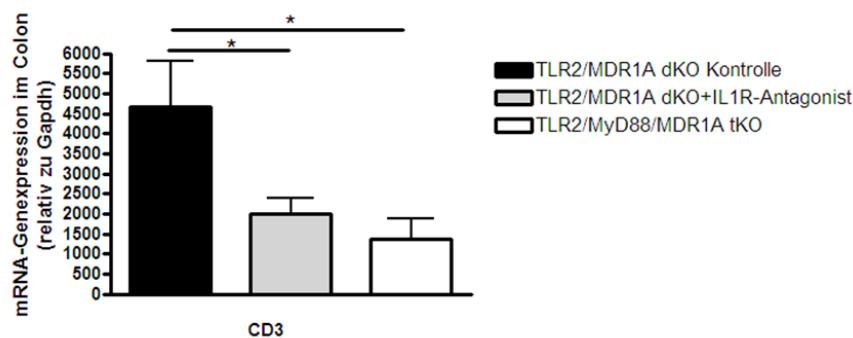


Abb. 3.26 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die mRNA-Genexpression von CD3 in TLR2/MDR1A dKO-Colongewebe.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonomischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die Expression von CD3 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CD3 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$.

Als Nächstes wurden die Effekte der Anakinra-Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen und der TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz auf die Th1-Polarisierung in der intestinalen Mukosa des Colons mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Colongewebe von Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zeigten erhöhte Genexpressionen von IL-1 β -, IL-12-, IFN- γ -, IL-2- und TNF- α -mRNA (entsprechend

zu Abb. 3.10). Die Anakinra-Behandlung führte zu einer signifikanten Herunterregulation von IL-12-mRNA, nicht jedoch der anderen Zytokine. Die Triple-Defizienz verhinderte den Anstieg dieser Th1-Zytokine vollständig (Abb. 3.27 A).

Die Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 sowie die Th17-Zytokine IL-21 und IL-27 blieben in allen untersuchten Gruppen weitgehend unverändert. Lediglich IL-23r- und IL-17-mRNA waren in TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Colongewebe signifikant herunterreguliert.

Die Analyse der Genexpression des Chemokins CCL2 zeigte, dass die erhöhte Expression von CCL2-mRNA in TLR2/MDR1A dKO-Colongewebe durch die Behandlung mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra nur zu einem nicht-signifikanten Grad gesenkt wurde (Abb. 3.28). Die CCL2-mRNA-Genexpression lag noch deutlich höher als bei TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen, in denen die Hochregulation des Chemokins komplett verhindert wurde.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die pharmakologische Blockade des IL-1R in TLR2/MDR1A-Defizienz zu einer Reduktion von IL-12-mRNA führte. Alle anderen Th1-Zytokine blieben weiterhin erhöht. Im Gegensatz dazu, verhinderte die genetische Deletion von MyD88 die Th1-Polarisierung im Colon bei TLR2/MDR1A-Defizienz auf mRNA-Ebene.

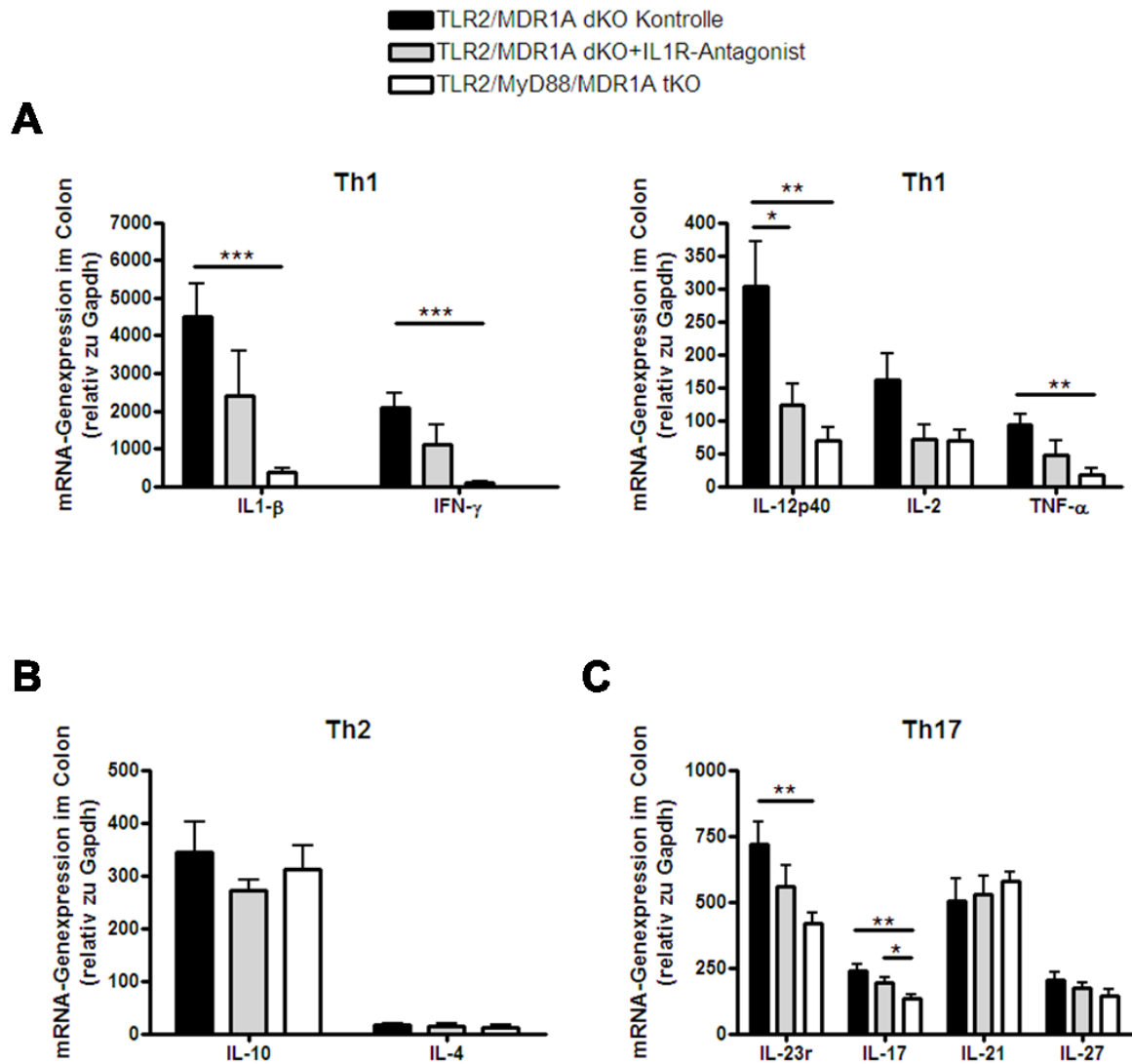


Abb. 3.27 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Th1-Polarisierung im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die mRNA-Genexpression von Th1- (A), Th2- (B) und Th17- (C) Zytokinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen der Th1/Th2/Th17-Zytokine wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

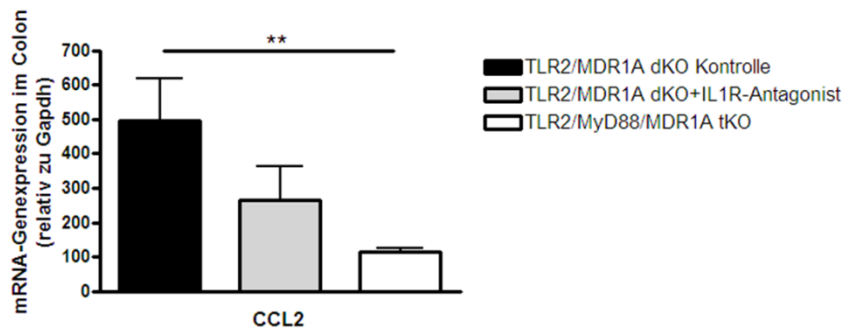


Abb. 3.28 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die mRNA-Genexpression von CCL2 im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die mRNA-Genexpression von CCL2 mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahl von CCL2 wurde für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen und als relative Konzentration angegeben. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n \geq 6$ Mäuse pro Gruppe). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.6.4 Rekrutierung von CD11b+-Zellen und IL-1 β -Produktion nach Blockade von IL-1R bzw. MyD88

Die Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und der Triple-Defizienz auf die Rekrutierung von CD11b+-Zellen wurde mit Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten des distalen Colons untersucht. Trotz der Milderung der Colitis in Anakinra-behandelten TLR2/MDR1A dKO, blieben weiterhin eine große Anzahl an CD11b+-Zellen in der LP vorhanden. Diese Daten bestätigten die Anwesenheit residualer inflammatorischer Zellen in der LP des Colons, die bereits in der H&E-Färbung zu sehen waren (Abb. 3.25 B). Des Weiteren war weiterhin IL-1 β -Produktion in Anakinra-behandelten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen nachweisbar, welche jedoch deutlich geringer war als in Kontroll-TLR2/MDR1A dKO. TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäuse wiesen im Gegensatz dazu nur vereinzelte CD11b+-Zellen und keine IL-1 β -Produktion auf.

Zusammengefasst hatte die pharmakologische Blockade des IL-1R in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen keinen Effekt auf die Rekrutierung/Persistenz von CD11b+-Zellen und hemmte die IL-1 β -Produktion nur teilweise. Die genetische Deletion von MyD88

hemmte hingegen die Infiltration von CD11b⁺-Zellen in die LP des Colons und die Produktion von IL-1 β vollständig.

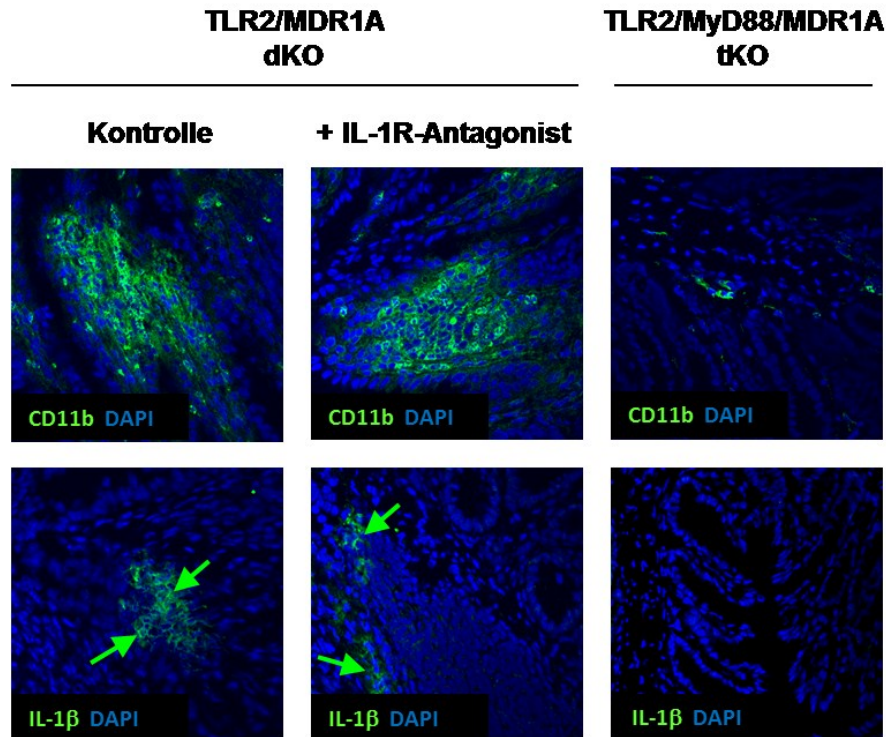


Abb. 3.29 Auswirkungen der Anakinra-Behandlung und MyD88-Defizienz auf die Rekrutierung von CD11b⁺- und IL-1 β ⁺-Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden im Alter von 5 Wochen für 4 Wochen mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra [+IL-1Ra] (1x täglich 100mg/kg KG) behandelt. Kontroll-TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden parallel mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die Rolle von MyD88 wurde in Mäusen untersucht, die triple-defizient für die Gene TLR2, MyD88 und MDR1A waren. Die Auswirkungen der Anakinra-Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen und TLR2/MyD88/MDR1A-Triple-Defizienz auf die Verteilung von CD11b⁺- und IL-1 β ⁺-Zellen (FITC: grün) im distalen Colon wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 40x/1,3, Öl, Scan Zoom 1,0; Zeiss LSM 510). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Grüne Pfeile deuten auf IL-1 β ⁺-Areale hin. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 3 Mäusen pro Gruppe. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

3.6.5 Wesentliche Ergebnisse zur Rolle des IL-1 β -Signalweges via MyD88 in der Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO

Zusammengefasst, führte die Blockade des IL-1R durch Anakinra zu einer Milderung der Colitis in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen. Dennoch blieben weiterhin zahlreiche CD11b⁺-Zellen und diverse Th1-Zytokine in der LP erhöht. Im Gegensatz dazu, führte die genetische Deletion von MyD88 zu einer vollständigen Inhibition der

Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A-Defizienz. Rekrutierung von CD11b⁺-Zellen und die Th1-Polarisierung wurden komplett verhindert.

3.7 Behandlung von MDR1A KO-Mäusen mit einem TLR2-Liganden

Unsere Arbeitsgruppe konnte vor kurzem zeigen, dass der TLR2-Ligand PCSK die ZO-1-assoziierte Barriereintegrität des intestinalen Epithels schützt (Cario et al. 2007) und die intestinale Entzündung im Modell der akuten chemisch-induzierten DSS-Colitis via TFF3 mildert (Podolsky et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TLR2-Defizienz die chronische Spontancolitis in MDR1A KO-Mäusen verschlimmert. Es wurde als Nächstes untersucht, ob die therapeutische TLR2-Stimulierung mit einem spezifischen TLR2-Liganden in MDR1A KO-Mäusen einen mukosa-protektiven Effekt hat und die Entwicklung chronischer Colitis verhindert. Männliche MDR1A KO-Mäuse (ursprünglicher Taconic Stamm) wurden von Tag 47pp bis Tag 67pp oral mit dem synthetisch-hergestellten TLR2-Liganden PCSK (150µg/ml) im Trinkwasser behandelt. Eine MDR1A KO-Gruppe und WT blieben parallel als Kontrollen unbehandelt.

3.7.1 Klinische Parameter nach PCSK-Behandlung

Zunächst wurde der Effekt der PCSK-Behandlung auf die klinischen Parameter der Colitis untersucht. Während MDR1A KO- und WT-Mäuse ein vergleichbares Körpergewicht aufwiesen, führte die PCSK-Behandlung zu einem geringfügig verringerten Körpergewicht von MDR1A KO-Mäusen (Abb. 3.30 A).

Das Colon wies in allen drei untersuchten Gruppen eine vergleichbare Länge im altersentsprechenden Normbereich auf (Abb. 3.30 B), jedoch waren diarrhoe-typische Symptome (weicher Faeces im Darmlumen) nur in unbehandelten MDR1A KO-Mäusen nachweisbar. PCSK-Behandlung verhinderte die Diarrhoeentwicklung in MDR1A KO-Mäusen.

Die Milz war in unbehandelten MDR1A KO-Kontrollmäusen signifikant vergrößert (Abb. 3.30 C), während die PCSK-Behandlung die Entwicklung einer Splenomegalie in MDR1A KO-Mäusen verhinderte.

Zusammengefasst führte die orale Behandlung mit dem TLR2-Liganden PCSK zu einer geringfügigen Reduktion des Körpergewichtes und zu einer Verhinderung der Splenomegalie und diarrhoe-typischer Symptome bei MDR1A KO-Mäusen.

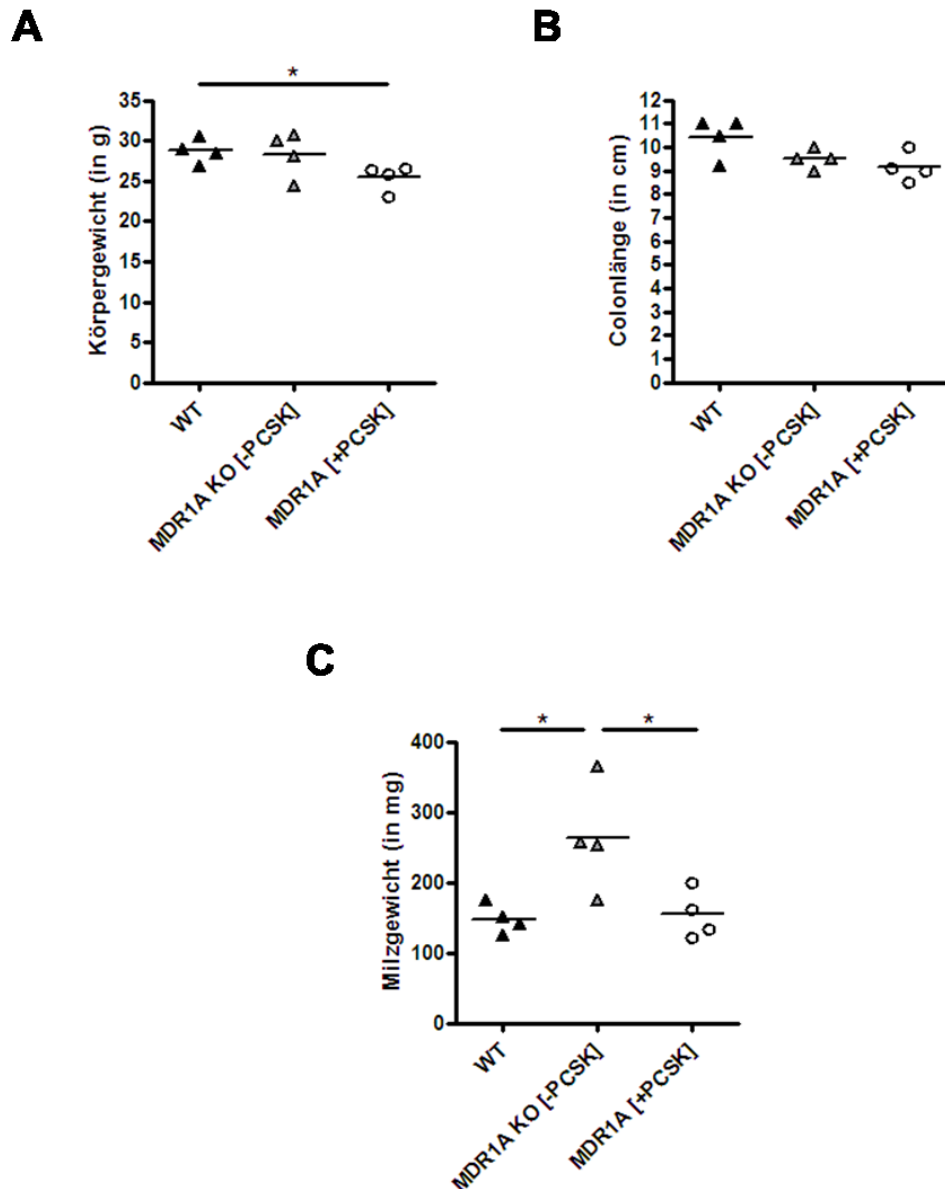


Abb. 3.30 Effekte der PCSK-Behandlung auf die klinischen Parameter in MDR1A KO-Mäusen. MDR1A KO-Mäuse (n=4) wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. Der Effekt der PCSK-Behandlung auf das Körpergewicht (A), Colonlänge (B) und Milzgewicht (C) wurde untersucht. *p<0.05.

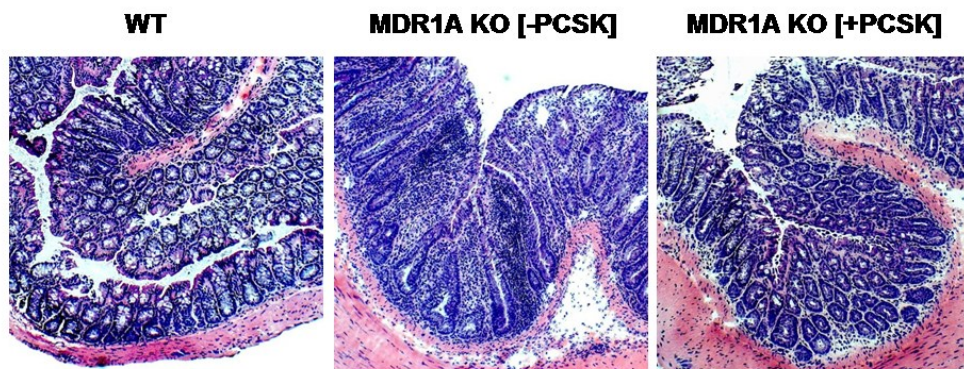
3.7.2 Histopathologie des distalen Colons nach PCSK-Behandlung

Als Nächstes wurde der Effekt der PCSK-Behandlung auf die Histopathologie des Colons untersucht. Wie erwartet zeigten unbehandelte MDR1A KO-Kontrollmäuse

Anzeichen einer Colitis, mit stark verdickter Darmmukosa, Becherzellverlust, Kryptenabszessen und Infiltration der LP durch inflammatorische Infiltrate (Abb. 3.31 A). Dies führte zu einem erhöhten Histologie-“Score” (8.25 ± 2.4) (Abb. 3.31 B). Die Behandlung mit dem TLR2-Liganden PCSK verhinderte jedoch die Colitisentwicklung und führte zu einem signifikant niedrigeren Histologie-“Score” (1.50 ± 0.3), der nur minimal höher als der von gesunden WT-Kontrollen (0.25 ± 0.3) war.

Zusammengefasst verhinderte die 20-tägige orale Behandlung mit dem TLR2-Liganden PCSK die Spontancolitisentwicklung bei MDR1A KO-Mäusen.

A



B

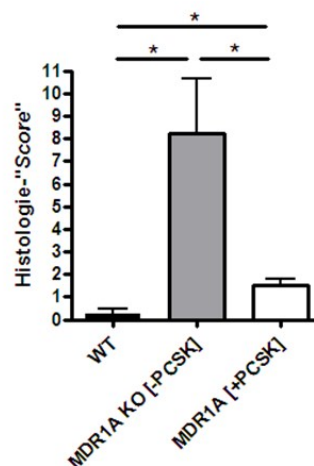


Abb. 3.31 Effekte der PCSK-Behandlung auf die Histopathologie des Colons von MDR1A KO-Mäusen.

MDR1A KO-Mäuse (n=4) wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. Der Effekt der PCSK-Behandlung auf die Histopathologie des Colons wurde untersucht. Gefrierschnitte vom distalen Colon von allen Gruppen wurden mit H&E angefärbt und unter dem *Nikon Eclipse E600-Mikroskop* beurteilt. Repräsentative Bilder sind für jede Gruppe gezeigt (Vergrößerung 20x) (A). Der Histologie-“Score” wurde anhand der Kriterien in **Tabelle 2.10** bestimmt (B). Daten sind als Mittelwert ± SEM (n=4 Mäuse pro Gruppe) dargestellt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.7.3 mRNA-Genexpression von Zytokinen nach PCSK-Behandlung

Als nächster Schritt wurde der Effekt der TLR2-Stimulation auf die Genexpression von verschiedenen Zytokinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen war die mRNA-Genexpression der Th-1-Zytokine IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α und IL-6 im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen signifikant erhöht. Die PCSK-Behandlung schwächte die Hochregulation dieser Th1-Zytokine deutlich ab, IFN- γ , IL-12, IL-2 und TNF- α waren aber im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen dennoch erhöht (Tabelle 3.4).

Zusätzlich war die mRNA-Genexpression der Th-2-Zytokine IL-4 und IL-10 in MDR1A KO erhöht. PCSK Behandlung führte jedoch zu einer deutlichen Herunterregulation beider Th2-Zytokine. Aber während die IL-4-mRNA-Expression nach der PCSK-Behandlung bis auf WT-Niveau gesenkt wurde, blieb die IL-10-mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden WT-Mäusen weiterhin erhöht.

Zusammengefasst führte die orale Behandlung von MDR1A KO-Mäusen mit dem TLR2-Liganden PCSK zu einer signifikanten (aber im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen nicht kompletten) Reduktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine auf mRNA-Genexpressionsanalyse im Colongewebe.

Tabelle 3.4 Auswirkungen der PCSK-Behandlung auf die mRNA-Zytokinexpression im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen.

MDR1A KO-Mäuse (n=4) wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. RNA wurde aus dem mittleren Colon isoliert, wie in *Material und Methoden* beschrieben, und auf die mRNA-Genexpression von verschiedenen Zytokinen mittels Real-Time qRT-PCR untersucht. Die Kopienzahlen der Zytokine wurden für die Auswertung auf das "housekeeping"-Gen Gapdh bezogen. Daten von MDR1A KO- und PCSK-behandelten MDR1A KO-Mäusen sind in Relation zu gesunden WT-Kontrollen gesetzt. In der Tabelle sind nur Gene aufgeführt, die mind. 1,5-fach verändert waren im Vergleich zu WT-Kontrollen. Fett gedruckte Werte stehen für Gene, die trotz PCSK-Behandlung im Vergleich zu WT-Kontrollen hoch exprimiert waren.

Genexpressions-analyse	MDR1A KO [-PCSK]	MDR1A KO [+PCSK]
ZO-1	0.44	0.80
IFNγ	45.84	9.62
TNFα	4.60	1.92
IL-2	5.22	2.21
IL-12p40	6.68	2.93
IL-6	4.39	1.23
IL-4	4.87	1.89
IL-10	4.97	3.35
IL-23R	1.85	2.01

3.7.4 Proteinexpression von Zytokinen und Chemokinen nach PCSK-Behandlung

Eine "Protein-Array"-Analyse wurde durchgeführt, um die Proteinexpression von 62 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen zu untersuchen (Tabelle 3.5). Die Proteinexpression des Th-1 Zytokins IL-12 und verschiedener Chemokine (CCL5, CCL9 CXCL9, CXCL16) war im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen stark erhöht. Diese Erhöhung wurde jedoch vollständig durch PCSK-Behandlung blockiert. Im Gegensatz dazu blieben IFN- γ und diverse Chemokine (CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL4) trotz Behandlung weiterhin erhöht.

Zusammengefasst führte PCSK-Behandlung von MDR1A KO-Mäusen zu einer teilweisen Reduktion an inflammatorischen Mediatoren auf Proteinebene im Colongewebe.

Tabelle 3.5 Auswirkungen der PCSK-Behandlung auf die Protein-Zytokinexpression im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen.

MDR1A KO-Mäuse (n=4) wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. Proteinlysate aus dem distalen Colon wurden mittels "Protein-Array-Analyse" auf die Expression von verschiedenen inflammatorischen Mediatoren untersucht. Die Tabelle zählt diejenigen Proteine in unbehandelten und PCSK-behandelten MDR1A KO-Mäusen auf, die mindestens 1,5-fach im Vergleich zu gesunden WT-Kontrollen hochreguliert waren (n=2 pro Genotyp). Fett gedruckte Werte stehen für Proteine, die trotz PCSK-Behandlung im Vergleich zu WT-Kontrollen hoch exprimiert waren.

Protein-expressions-analyse	MDR1A KO [-PCSK]	MDR1A KO [+PCSK]
IFNγ	3.83	3.39
IL-12p40	12.58	0.87
CCL2	3.07	2.11
CCL5	20.74	1.23
CCL9	2.39	0.82
CCL20	8.60	2.16
CXCL1	5.36	2.33
CXCL4	2.25	3.54
CXCL9	6.74	0.82
CXCL16	4.48	1.17
CD40	4.18	1.52

3.7.5 Analyse der Barriereintegrität nach PCSK-Behandlung

Da bereits gezeigt worden ist, dass PCSK-Behandlung Effekte auf die intestinale epitheliale Barriereintegrität hat (Cario et al. 2004; Cario et al. 2007), wurden als Nächstes die Expression des "tight junction"-Proteins ZO-1 und des "gap junction"-

Proteins Cx43 mit Western-Blot im Colongewebe untersucht (Abb. 3.32 A). Western-Blot-Analyse zeigte eine Akkumulation von mehreren Cx43-Isoformen und einen gleichzeitigen Verlust des ZO-1-Proteins in MDR1A KO-Därmen. Die 20-tägige PCSK-Behandlung blockierte diese Effekte vollständig.

Die Phosphorylierung von Cx43 am Serin-Rest 368 senkt die Leitfähigkeit des Ionenkanals und wird daher als Marker für gestörte interzelluläre "*gap junction*"-Kommunikation gesehen (Lampe et al. 2000; Richards et al. 2004). Darmgewebe von MDR1A KO-Mäusen wies eine Akkumulation von nicht-phosphoryliertem und Ser368-phosphoryliertem Cx43-Protein auf (Abb. 3.32 A). Die PCSK-Behandlung verhinderte die Akkumulation von Cx43-Protein im Colongewebe der MDR1A KO-Mäuse.

Die zelluläre Proteinexpression von Cx43 und ZO-1 wurde morphologisch mit Immunfluoreszenzfärbungen im Darmgewebe mit oder ohne PCSK-Behandlung untersucht (Abb. 3.32 B). Cx43 akkumulierte in IECs von MDR1A KO-Mäusen und formte größere zytoplasmatische Aggregate, während Cx43 lediglich an den interzellulären Zellverbindungen in WT- und PCSK-behandelten Mäusen lokalisiert war. Der Verlust von ZO-1 in IECs von MDR1A KO-Mäusen (wie bereits bei Colitis im Western-Blot gesehen Abb. 3.32 A), wurde mit der Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 3.32 B) bestätigt. Die Herunterregulation der ZO-1-Proteinexpression in der intestinalen Mukosa wurde jedoch durch die Behandlung der MDR1A KO-Mäuse mit PCSK verhindert.

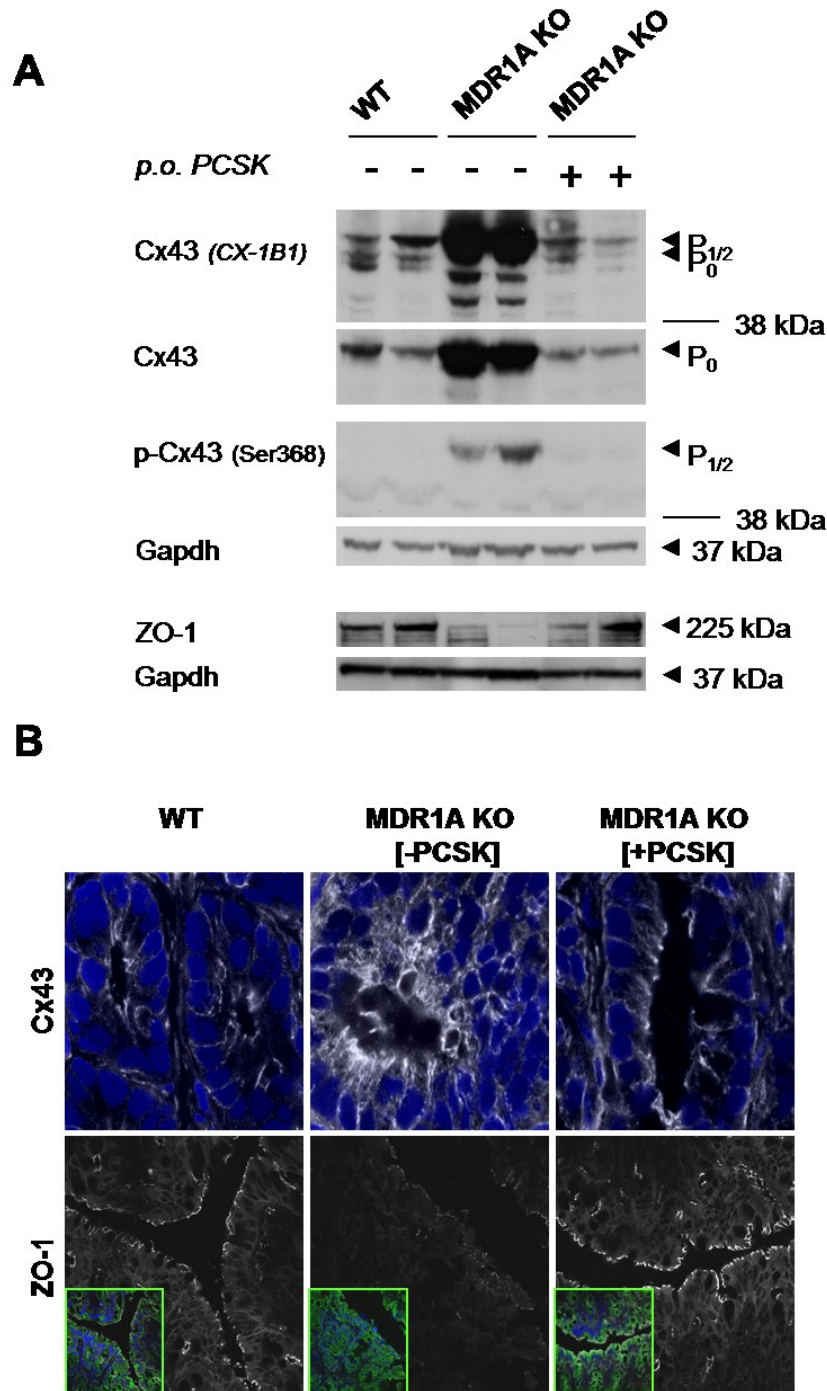


Abb. 3.32 Effekte der PCSK-Behandlung auf die Expression von “tight/gap junction”-Proteinen. MDR1A KO-Mäuse wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. Der Effekt der PCSK-Behandlung auf die Expression verschiedener Isoformen von Cx43 und ZO-1 wurde mittels Western-Blot-Analyse, wie in *Material und Methoden* beschrieben, durchgeführt. “Reproben” des Blots mit anti-Gapdh diente als Ladungskontrolle (A). Die Lokalisation von Cx43 und ZO-1 (Cy5: weiß) in der Zelle wurde mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Lasermikroskop untersucht (Plan-Apochromat 63x/1,4, Öl, Scan Zoom 2,0 (obere Reihe) bzw. 0,7 (untere Reihe); Zeiss LSM 510) (B). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Inserts in der unteren Reihe zeigen eine Co-Färbung mit pan-Cytokeratin (FITC:grün) desselben Ausschnitts. Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Bildausschnitte der Präparate von je 2 Mäusen pro Gruppe. Eine Kontrollfärbung mit der entsprechenden IgG-Kontrolle wurde für jeden Antikörper durchgeführt, um unspezifische Färbung auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Western-Blot-Analyse in Abb. 3.32 A zeigte eine erhöhte Proteinexpression verschiedener Cx43-Isoformen im Darmgewebe von MDR1A KO-Mäusen. Um einen Anstieg des gesamten Cx43-Proteins in MDR1A KO-Mäusen nachzuweisen, wurden die Proteinlysate zur Proteindephosphorylierung mit alkaliner Phosphatase vorinkubiert. Lysate wurden anschließend mit Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 3.33). Alle Cx43-Isoformen wurden durch die Behandlung mit alkaliner Phosphatase in den de-phosphorylierten Zustand überführt. Auch der Gesamt-Cx43-Protein-Gehalt war in MDR1A KO-Colitis-Mäusen deutlich erhöht – der Anstieg wurde jedoch durch die Behandlung mit PCSK vollständig verhindert.

Die Erhöhung des Cx43-Proteins ist wahrscheinlich nicht auf eine erhöhte Proteinsynthese zurückzuführen, sondern eher auf Defekte in der Proteindegradierung, da Cx43 auf mRNA-Ebene nicht erhöht war (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wiesen MDR1A KO-Mäuse intestinale epitheliale Defekte in den Barriere-Proteinen Cx43 und ZO-1 auf. Die Akkumulation von Cx43 und der Verlust von ZO-1 konnten durch Behandlung der MDR1A KO-Mäuse mit dem TLR2-Liganden PCSK wirksam verhindert werden.

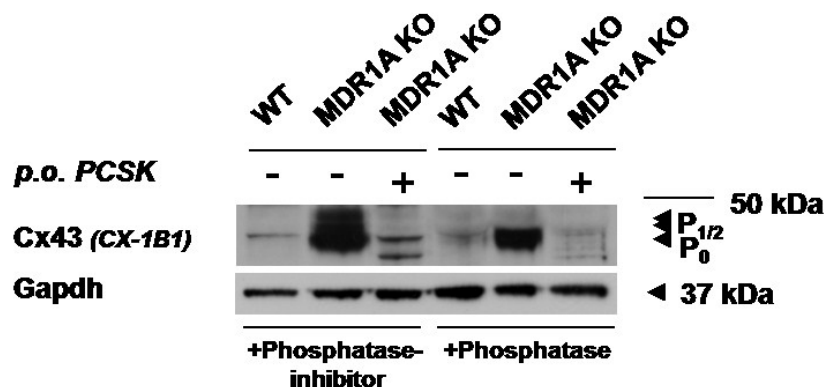


Abb. 3.33 Analyse des Gesamtproteingehaltes an Cx43.

MDR1A KO-Mäuse wurden im Alter von 47 Tagen pp für 20 Tage mit dem TLR2-Liganden PCSK behandelt. Kontroll-MDR1A KO- und WT-Mäuse blieben unbehandelt. Der Effekt der PCSK-Behandlung auf die Cx43-Expression wurde mittels Western-Blot Analyse, wie in *Material und Methoden* beschrieben, durchgeführt. Um die Gesamt-Expression von Cx43 zu untersuchen wurden Proteinlysate mit alkaliner Phosphatase inkubiert, welches zur Dephosphorylierung der Proteine führt. Der Cx43-Proteingehalt wurde anschließend mit einem anti-Cx43-Antikörper (Klon CX-1B1) auf der Membran nachgewiesen. "Reproben" des Blots mit anti-Gapdh diente als Ladungskontrolle.

3.7.6 Wesentliche Ergebnisse zur Behandlung mit einem TLR2-Liganden

Zusammengefasst führte die Behandlung von MDR1A KO-Mäusen mit dem TLR2-Liganden PCSK zu einer Verhinderung der Colitisentwicklung, die mit Reduktion zahlreicher Zytokine und Chemokine einherging. Desweiteren verhinderte die PCSK-Behandlung Defekte in der intestinalen epithelialen Barriere der MDR1A KO-Mäuse. Trotz Verhinderung der klinischen und histopathologischen Colitisentwicklung waren jedoch einige proinflammatorische Mediatoren im Colongewebe von MDR1A KO-Mäusen erhöht.

3.8 Rolle des C57BL6/J-Hintergrundes auf die Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen

Um festzustellen, ob die Colitisentwicklung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen vom genetischen Hintergrund beeinflusst wird, wurden MDR1A KO-Mäuse [FVB/N] für mehr als 7 Generationen in TLR2 KO-Mäuse [C57BL6/J] zurückgekreuzt. TLR2/MDR1A dKO-Mäuse wurden mit TLR2 KO-Mäusen verglichen. TLR2 KO-Mäuse entwickeln auch im Alter keine Anzeichen einer Spontancolitis (Cario et al. 2007; Albert und Marshall 2008). TLR2 KO-Mäuse dienten daher als Kontrollen bei Untersuchungen zur Rolle von TLR2/MDR1A-Doppel-Defizienz im C57BL6/J-Hintergrund. Mäuse wurden im Alter von 17-20 Wochen untersucht. Eine zusätzliche Gruppe mit Mäusen im Alter von 57 Wochen und älter wurde ebenfalls untersucht, um eine verspätete Colitisentwicklung auszuschließen.

3.8.1 Klinische Parameter

Zunächst wurden die Auswirkungen der TLR2/MDR1A-Doppel-Defizienz im C57BL6/J-Hintergrund auf die klinischen Parameter untersucht. Körpergewicht, Colonlänge und Milzgewicht von 17-20 Wochen alten TLR2/MDR1A dKO-Mäusen waren alle signifikant reduziert im Vergleich zu gleichaltrigen TLR2 KO-Mäusen (Abb. 3.34), lagen jedoch noch im Normbereich. Keine der untersuchten Gruppen entwickelte eine Diarrhoe.

Zusammengefasst wiesen TLR2/MDR1A dKO-Mäuse im C57BL6/J-Hintergrund zwar minimale Abweichungen der klinischen Parameter auf, diese waren jedoch alle noch im Normbereich und deuteten nicht auf Anzeichen einer Colitis hin.

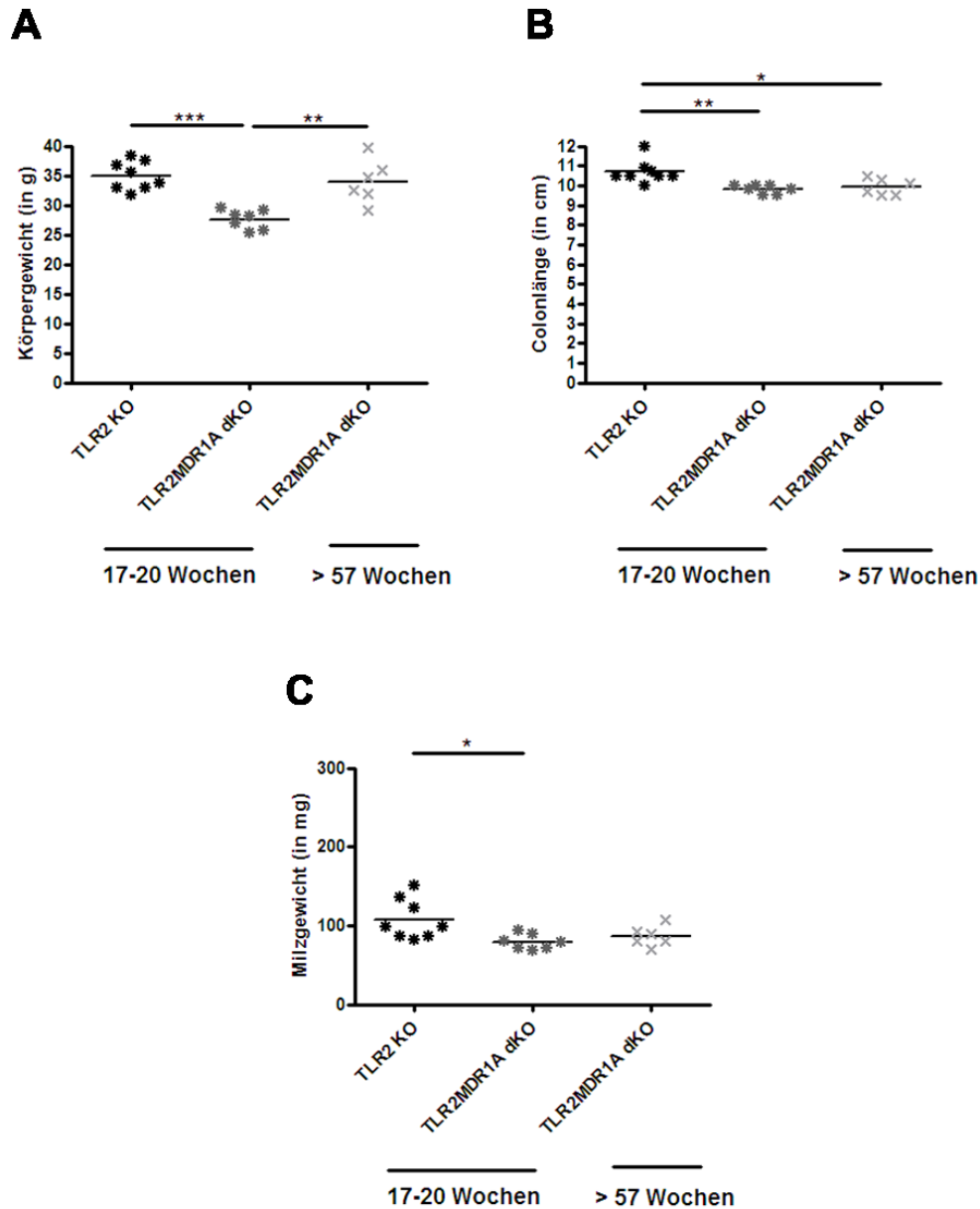


Abb. 3.34 Auswirkungen des genetischen Hintergrundes auf die klinischen Parameter von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

MDR1A KO-Mäuse [FVB/N] wurden für mehr als 7 Generationen in TLR2KO-Mäuse [C57BL6/J] zurückgekreuzt. 17-20 Wochen alte TLR2 KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse sowie eine Gruppe alter TLR2/MDR1A KO-Mäuse (>57 Wochen) wurden hinsichtlich ihres Körpergewichts (A), Colonlänge (B) und Milzgewichts (C) untersucht (n≥6). *p<0.05, **p<0.01, ns: nicht signifikant.

3.8.2 Histopathologie des Colons

Als Nächstes wurden die Auswirkungen von TLR2/MDR1A-Doppel-Defizienz im C57BL6/J-Hintergrund auf histologischer Ebene untersucht.

TLR2/MDR1A dKO-Mäuse zeigten eine normale Histologie, die vergleichbar war mit gesunden TLR2 KO-Kontrollmäusen (Abb. 3.35 A). Das gesunde Erscheinungsbild des Colons führte zu einem niedrigen histologischen “Score” (Abb. 3.35 B) in allen drei untersuchten Gruppen ($1,06 \pm 0,2$ (TLR2 KO) vs. $1,57 \pm 0,1$ (TLR2/MDR1A dKO) vs. $0,75 \pm 0,3$ (TLR2/MDR1A dKO >57 Wochen)).

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass TLR2/MDR1A dKO-Mäuse im C57BL6/J-Hintergrund keine Colitis entwickelten.

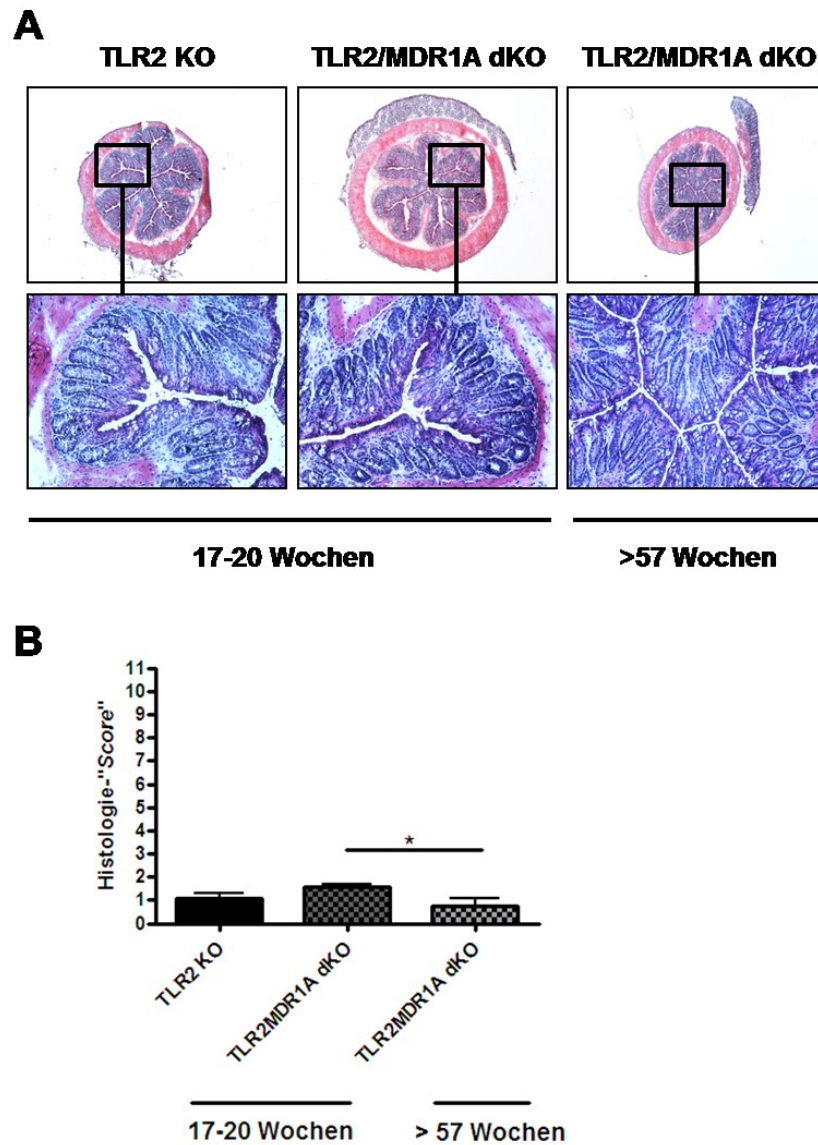


Abb. 3.35 Auswirkungen des genetischen Hintergrundes auf die Histopathologie des Colons von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen.

MDR1A KO-Mäuse [FVB/N] wurden für mehr als 7 Generationen in TLR2KO-Mäuse [C57BL6/J] zurückgekreuzt. 17-20 Wochen alte TLR2 KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse sowie eine Gruppe alter TLR2/MDR1A KO-Mäuse (>57 Wochen) wurden hinsichtlich ihrer Histopathologie des Colons untersucht. Gefrierschnitte vom distalen Colon von allen Gruppen wurden mit H&E angefärbt und unter dem *Nikon Eclipse E600-Mikroskop* beurteilt. Repräsentative Bilder sind für jede Gruppe gezeigt (Vergrößerung: obere Reihe 4x, untere Reihe 20x) (A). Der Histologie-„Score“ (B) wurde anhand der Kriterien in **Tabelle 2.10** bestimmt. Daten sind als Mittelwert ± SEM (n≥6 Mäuse pro Gruppe) dargestellt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4 Diskussion

Variationen des humanen ABCB1/MDR1-Gens prädisponieren zu CU (Schwab et al. 2003; Potocnik et al. 2004; Ho et al. 2005; Ho et al. 2006) und Patienten mit CED weisen eine erniedrigte ABCB1/MDR1-mRNA-Genexpression im entzündeten Colon auf (Langmann et al. 2004; Blokzijl et al. 2007). MDR1A KO-Mäuse (Schinkel et al. 1994) entwickeln eine chronische Spontancolitis (Panwala et al. 1998), die im Phänotyp der humanen CU (Warren und Sommers 1949; Xavier und Podolsky 2007) ähnelt: mit Kryptenabszessen, Becherzellverlust, Verdickung der intestinalen Mukosa entlang des gesamten Colons und Infiltration der LP durch inflammatorische Zellen. Daher stellen MDR1A KO-Mäuse ein adäquates Modell zur Untersuchung der Pathogenese der humanen CU dar. Die Mechanismen der angeborenen Immunantwort in der Pathophysiologie der chronischen Spontancolitis bei MDR1A-Defizienz sind bisher jedoch nicht geklärt. Die Rolle von TLRs in der CED-Pathogenese wird kontrovers diskutiert (Cario 2010b) und ist bisher nicht im murinen MDR1A KO-Modell untersucht worden. Initiale eigene Studien zeigten eine selektive Erhöhung der TLR2-mRNA-Expression im entzündeten Colon von MDR1A KO-Mäusen. Daher wurde in dieser Arbeit die funktionelle Rolle des TLR2-Signalweges bei Colitis im Rahmen der MDR1A-Defizienz näher untersucht.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Deletion von TLR2 zu einer rapiden und fulminanten Progression der murinen Spontancolitis bei MDR1A-Defizienz führt. Klinisch war dies v.a. gekennzeichnet durch eine stärkere Reduktion der Gewichtszunahme und deutlichen Verschlechterung der Pancolitis, im Vergleich zu TLR2-exprimierenden MDR1A KO-Mäusen. Histologisch war die Colitis in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mit frühzeitiger Infiltration der intestinalen LP durch v.a. CD11b⁺-Zellen assoziiert, gefolgt im Verlauf von CD4⁺-, F4/80⁺- und Gr-1⁺-Zellen. Die Deletion von TLR2 in MDR1A KO-Mäusen führte zu einer deutlichen Verlagerung in Richtung Th1-vermittelter Immunantwort, mit erhöhter Expression von IL-1 β , IL-12, IFN- γ und zahlreichen Chemokinen. Umgekehrt führte die Aktivierung von TLR2, durch orale Prophylaxe mit dem spezifischen TLR2-Liganden PCSK, zu einer signifikanten Verzögerung der Colitisentwicklung in MDR1A KO-Mäusen. Klinisch verhinderte die Gabe von PCSK die Diarrhoeentwicklung und die Splenomegalie bei MDR1A KO-Mäusen. Dies korrelierte mechanistisch mit Erhaltung der intestinalen

epithelialen Barriereintegrität. Histologisch waren nach PCSK-Behandlung deutlich weniger inflammatorische Infiltrate in der intestinalen LP zu finden. Des Weiteren führte die Aktivierung von TLR2 zur Reduktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine im Colongewebe. Trotz klinischer und histologischer Zeichen der Verzögerung der Colitisentwicklung unter PCSK-Behandlung waren aber dennoch einige proinflammatorische Faktoren (IFN- γ , CC-Chemokine) erhöht (veröffentlicht in (Ey et al. 2009)).

Das in der vorliegenden Arbeit neu-generierte Modell der TLR2/MDR1A dKO-Colitis adressiert erstmals die Frage zur funktionellen Rolle von TLR2 in CU-ähnlicher Spontancolitis. Die Rolle von TLR2 in der Colitispathogenese wurde bis jetzt lediglich in *induzierten* (chemisch oder infektiös) Colitismodellen in der Maus untersucht. Für TLR2 konnte in mehreren Studien eine antiinflammatorische Rolle im *akuten* DSS-induzierten Colitismodell nachgewiesen werden. DSS-Colitis wird durch orale Gabe von Dextran-Natriumsulfat (DSS) akut ausgelöst (Okayasu et al. 1990), welches eine chemisch-induzierte, toxische Schädigung der intestinalen epithelialen Barriere bewirkt und sekundär zu einer Entzündung der LP führt. Dabei zeigen TLR2 KO-Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der *akuten* DSS-Colitis mit verzögerter Wundheilung der intestinalen epithelialen Barriere (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Cario et al. 2007; Podolsky et al. 2009). Umgekehrt führt die Aktivierung von TLR2 durch PCSK zu einer Linderung der *akuten* DSS-Colitis (Cario et al. 2007). Das Modell der DSS-Colitis reflektiert jedoch aufgrund der exogenen Toxizitätsinduktion im intestinalen Epithel nur unbefriedigend die Pathophysiologie der humanen CU (Xavier und Podolsky 2007). Neben der schützenden Rolle im DSS-Colitismodell, wirkt TLR2 auch bei *Citrobacter rodentium*-induzierter Colitis durch Aufrechterhaltung der IEC-Barriereintegrität protektiv (Gibson et al. 2008). Im *Helicobacter hepaticus*-Infektionsmodell von RAG2 KO-Mäusen oder bei Blockade von IL-10 führt jedoch die Deletion von TLR2 nicht zu einer Verbesserung der T-Zell-abhängigen Colitis (Boulard et al. 2010). Allerdings repräsentieren *Citrobacter rodentium* und *Helicobacter hepaticus* maus-spezifische pathogene Keime, die bei der humanen CU keine Relevanz haben.

Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass TLR2 das intestinale Epithel durch Aufrechterhaltung der "*tight junction*"-assoziierten Barriereintegrität schützt (Cario et al. 2004; Cario et al. 2007). So führt die Aktivierung von TLR2 zur

Stabilisierung und Festigung des "*tight junction*"-Proteins ZO-1 in der IEC-Barriere. Bestehende Studien sind sich darin einig, dass es in MDR1A KO-Mäusen im Verlauf zu einer Zerstörung der intestinalen Barriere kommt (Panwala et al. 1998; Resta-Lenert et al. 2005; Collett et al. 2008). Resta-Lenert et al. konnten zeigen, dass MDR1A KO-Mäuse bereits vor Einsetzen der Colitis Barrieredefekte der intestinalen Mukosa und eine bakterielle Translokation unter konventionellen Haltungsbedingungen aufweisen (Resta-Lenert et al. 2005). Dennoch waren "*tight junction*"-Proteine, wie ZO-1, in diesem Alter nicht dysreguliert. Dies erfolgte erst in späterem Alter, nach Einsetzen der Colitis. Im Gegensatz dazu fanden Collett et al. keine erhöhte Permeabilität im Colon der MDR1A KO-Mäuse im Alter von 4-5 Wochen (Collett et al. 2008). Erst im Alter von 12-16 Wochen war eine erhöhte intestinale Permeabilität nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit führte der Verlust von TLR2 im MDR1A KO-Colitismodell primär zu keiner Veränderung in der Expression des "*tight junction*"-Proteins ZO-1. Andere "*tight junction*"-Proteine der intestinalen Barriere wurden hier nicht untersucht. Zu späterem Zeitpunkt zeigten MDR1A KO-Mäuse bei Colitis eine Dysregulation in der Proteinexpression und -verteilung der Barriereproteine ZO-1 und Cx43. Die Aktivierung von TLR2 durch prophylaktische PCSK-Therapie führte zu vollständiger Normalisierung der ZO-1- und Cx43-Proteinexpression und Morphologie. Diese Daten legen nahe, dass die TLR2-Stimulation auch im MDR1A Colitismodell die IEC-Barriereintegrität aufrechterhält. Mit den vorliegenden Daten kann jedoch nicht eindeutig festgestellt werden, ob der Barrieredefekt primär oder sekundär erfolgt. Ob die Deletion von TLR2 in MDR1A KO-Mäusen zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität und somit zu einer erhöhten Translokation von kommensalen Bakterien bzw. Antigenen führt, müssen weiterführende Untersuchungen klären.

IECs sind die ersten Zellen, die mit Bakterien in Kontakt kommen und bei Stimulation mit Bakterien in der Lage sind, Chemokine/Zytokine zu produzieren (Eckmann et al. 1993; Yang et al. 1997). Somit kann das Epithel ein Signal aussenden, welches zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen führt (Eckmann et al. 1995; Kagnoff und Eckmann 1997; Cario 2010b). Das Modell der TLR2/MDR1A dKO-Colitis in der vorliegenden Arbeit war gekennzeichnet durch frühe Hochregulation von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen, u.a. CCL2, welches für die Rekrutierung

von Immunzellen, u.a. von Monozyten/Makrophagen, in Gewebe wichtig ist. Es ist möglich, dass CCL2 von IECs als direkte Reaktion auf translozierte Kommensale produziert wird (Waterhouse et al. 2001).

Murine Spontancolitismodelle sind im Allgemeinen stark abhängig von der kommensalen Mikroflora. MDR1A KO-Mäuse entwickeln unter keimfreien Bedingungen keine Colitis (Wilk et al. 2005) und sowohl *prophylaktische* als auch *therapeutische* Antibiose verhindern die Colitis (Panwala et al. 1998). Mechanistisch konnte in der vorliegenden Studie durch Antibiotika-Versuche gezeigt werden, dass die Exazerbation der Colitisentwicklung und -progression in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen kommensal-abhängig ist. Die Colitisprogression unter TLR2/MDR1A Doppel-Deletion wurde durch Antibiose sowohl klinisch als auch histopathologisch verhindert bzw. signifikant gemildert. *Prophylaktische* Antibiotika-Behandlung blockierte die Colitisentwicklung komplett und verhinderte dadurch klinisch die Diarrhoeentwicklung, die Gewichtsreduktion, die Ausbildung einer Splenomegalie und die Verkürzung bzw. Verdickung der Colonwand. *Therapeutische* Antibiotika-Behandlung milderte die Colitis deutlich ab und verhinderte ebenfalls die Diarrhoeentwicklung und die Verkürzung bzw. Verdickung der Colonwand. Die Th1-Polarisierung und Zellrekrutierung konnte durch *prophylaktische* Antibiotika-Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen verhindert werden. Im Gegensatz dazu, blockierte die *therapeutische* Antibiotika-Behandlung von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen die Th1-Polarisierung nur teilweise, während die CD11b⁺-Zellrekrutierung und deren IL-1 β -Produktion vollständig verhindert wurden. Es waren jedoch weiterhin zahlreiche CD4⁺-Zellen in der LP des Colons vorhanden. Die Th1-Zytokine IL-12 und IL-2, die für die Aufrechterhaltung einer Th1-Immunantwort und Proliferation von T-Zellen wichtig sind (Kubin et al. 1994), blieben weiterhin erhöht. Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass das Einwandern von IL-1 β -produzierenden CD11b⁺-Zellen in die LP von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen kommensal-abhängig getriggert wird. Die wahrscheinlich sekundär getriggerte Th1-Polarisierung ist jedoch nicht reversibel.

Trotz Antibiose scheinen residuale CD4⁺-T-Zellen weiterhin proinflammatorische Zytokine zu produzieren und dadurch die mukosale Entzündung weiter zu unterhalten. Bei CU-Patienten könnte Antibiose als unterstützende Therapiemaßnahme sinnvoll in Kombination mit immunmodulierenden Substanzen sein, die eine überschießende Immunantwort verhindern. Die therapeutische

Wirksamkeit von Antibiotika-Behandlung bei humaner CU wird aber kontrovers diskutiert (Rahimi et al. 2007; Khan et al. 2011). Während Antibiose in einigen Studien sichtbare Erfolge erzielte (Burke et al. 1990; Turunen et al. 1998; Ohkusa et al. 2005), war in anderen Studien keinerlei Wirkung festzustellen (Chapman et al. 1986; Lobo et al. 1993; Mantzaris et al. 1994; Mantzaris et al. 2001).

Die Antibiose in der vorliegenden Arbeit wurde durch orale Behandlung der Mäuse (Dauer 8 Wochen) mit den Reserve-Breitbandantibiotika Imipenem und Vancomycin durchgeführt (Rath et al. 2001). Imipenem ist beim Menschen in Deutschland zur oralen Applikation nicht zugelassen. Eine solche Langzeit Antibiotika-Behandlung birgt das Risiko von Nebenwirkungen und der Herausselektionierung von multi-resistenten Bakterien, wie dem Vancomycin-resistenten *Enterococcus* (Brandl et al. 2008). Nosokomiale Infektion und luminale Überwucherung mit diesem resistenten Stamm kann zu hoher Morbidität und Mortalität führen (Carmeli et al. 2002). Daher ist die Antibiose, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, sicher keine zukünftige Routine-Therapieoption bei humaner CED.

Studien haben gezeigt, dass MDR1A KO-Mäuse variabel im Alter von 8-36 Wochen klinische und histologische Anzeichen einer Colitis entwickeln. Der Zeitpunkt des Beginns scheint von den Umwelteinflüssen und Haltungsbedingungen der jeweiligen Tierhaltungseinrichtung abhängig zu sein (Resta-Lenert et al. 2005; Wilk et al. 2005). Alle untersuchten KO- und WT-Mäuse in der vorliegenden Arbeit wurden in demselben SPF-Raum gehalten und waren damit identischen Umwelt- und Haltungsbedingungen ausgesetzt.

Des Weiteren ist die Colitisentwicklung von MDR1A KO-Mäusen abhängig vom genetischen Hintergrund (Staley et al. 2009). Somit entwickeln MDR1A KO-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund keine chronische Spontancolitis, weisen aber dennoch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber chemisch induzierter DSS-Colitis auf. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Doppel-Defizienz von TLR2 und MDR1A in C57BL/6-Mäusen auch in spätem Alter zu keinen Anzeichen einer Spontancolitis führte. Der genetische Hintergrund scheint demnach TLR2/MDR1A dKO-Mäuse vor der exazerbierten Colitis zu schützen.

Pathogene Keime können den Verlauf der murinen Spontancolitis generell modulieren. So führt die pathogene Infektion von MDR1A KO-Mäusen mit

Helicobacter bilis zu einer Beschleunigung der Colitisentwicklung, während die Infektion mit *Helicobacter hepaticus* die Colitisentwicklung verzögert (Maggio-Price et al. 2002). *Helicobacter hepaticus* ist ein muriner pathogener Keim und kommt nicht im Menschen vor. Auch Viren, wie der *murine Norovirus* (MNV), können die Colitisentwicklung bei MDR1A KO-Mäusen beeinflussen (Lencioni et al. 2008). Auswirkungen auf den Colitisverlauf durch eine Infektion mit *Helicobacter* oder MNV können im vorliegenden Modell der TLR2/MDR1A dKO-Colitis aber ausgeschlossen werden, da alle Mäuse unter strikten SPF-Bedingungen gehalten wurden. Durch routinemäßige Untersuchungen, die zwei Mal jährlich erfolgten, wurde sichergestellt, dass alle Mäuse absolut frei von *Helicobacter* und MNV, sowie anderen relevanten pathogenen bzw. opportunistischen Keimen, waren.

Nicht nur Umwelt- sondern auch genetische Faktoren können die Zusammensetzung der kommensalen Mikroflora im gastrointestinalen Lumen modulieren und so Colitis auslösen bzw. den Verlauf beeinflussen (Sartor 2008a; Khor et al. 2011). Vor kurzem zeigten Nones et al., dass MDR1A KO-Mäuse bereits vor Auftreten der ersten Colitiszeichen eine veränderte bakterielle Komposition im Caecum als WT-Mäuse aufweisen (Nones et al. 2009). Die totale Bakterienzahl im Caecum von MDR1A KO-Mäusen war deutlich geringer als die von WT-Mäusen. MDR1A KO-Mäuse zeigten auch eine Verschiebung im Vorkommen der Bakterienstämme mit erhöhter Anzahl an *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, und *Bacteroides thetaiotaomicron*. Kellermayer et al. zeigten, dass *Firmicutes* zu einem geringeren Prozentsatz in TLR2 KO-Mäusen (C57BL/6) vorhanden ist, während die Häufigkeit von *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* gegenüber WT erhöht ist (Kellermayer et al. 2011). *Firmicutes* scheint eine protektive Rolle zu haben (Sartor 2008b; Sokol et al. 2009), während *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* eher proinflammatorisch und mit Colitis assoziiert sind (Lucke et al. 2006; Piao et al. 2011). Allerdings wurden die untersuchten WT- und TLR2 KO-Mäuse in der Studie von Kellermayer et al. separat gezüchtet und stammten von unterschiedlichen Elterntieren ab. Diese Zuchtbedingungen können zu Verschiebungen der kommensalen Mikrobiota in der Maus geführt haben, unabhängig vom Genotyp, da die individuelle kommensale Zusammensetzung anscheinend maßgeblich durch das Muttertier bestimmt wird (Ley et al. 2005). Ob die progressive Colitis bei Deletion von TLR2 in MDR1A-Defizienz mit einer veränderten Bakterien-Komposition (primär oder sekundär) assoziiert ist, müssen zukünftige Studien, die nicht Teil dieser Arbeit sind, klären.

Die Funktionen von TLR2 scheinen vielfältig und zelltypspezifisch zu sein (Cario 2008). Neben der Barriere-unterstützenden Funktion hat TLR2-Signalisierung auch anti-apoptotische Effekte auf die intestinale Mukosa durch Produktion und Sekretion von TFF3 (*“Trefoil factor 3”*) durch Becherzellen (Podolsky et al. 2009). TFF3 ist ein wichtiger Faktor in der Wundheilung und Gewebeprotektion. Die bereits erniedrigte TFF3-Produktion blieb im vorliegenden Modell der MDR1A KO-Colitis, zumindest auf mRNA-Ebene, durch die Deletion von TLR2 unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Auf humanen dendritischen Zellen und PBMCs führt die Stimulation von TLR2 zur Sekretion des antiinflammatorischen Th2-Zytokins IL-10, das Th1-Zytokine inhibieren kann (Re und Strominger 2004). Andererseits legten andere Studien nahe, dass die Aktivierung von TLR2 auf Th1-Zellen zu einer proinflammatorischen Antwort, mit erhöhter Proliferation und Produktion von IFN- γ (Komai-Koma et al. 2004; Imanishi et al. 2007) führt, während die Aktivierung von TLR2 auf Th2-Zellen keine Auswirkungen hat. In dem vorliegenden Modell der MDR1A KO-Colitis hatte die Deletion von TLR2 eine erhöhte Produktion von Th1-Zytokinen zur Folge, aber hatte keine Auswirkung auf die Produktion von Th2-Zytokinen, wie IL-10. Eine dysregulierte Th2-Immunantwort scheint hier nicht vorzuliegen.

Es ist vorstellbar, dass es in Abwesenheit von TLR2 als Kompensationsmechanismus zu einer erhöhten pathologischen Aktivierung von anderen TLRs auf LP-Zellen wie TLR4 kommt, welches dann zur Th1-Polarisierung führt. Erste Hinweise auf eine veränderte TLR4-Aktivierung in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen liefern Experimente aus der vorliegenden Arbeit, in denen LPS-stimulierte peritoneale Makrophagen von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen eine Hyperreaktivität mit erhöhter IL-1 β -Produktion im Vergleich zu TLR2-exprimierenden peritonealen Makrophagen zeigten.

Neben der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, können Makrophagen Pathogene auch direkt durch Phagozytose beseitigen. Einige Studien haben eine Rolle von TLR2 im Phagozytoseprozess gezeigt. Die Deletion von TLR2 stört demnach die Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* (Letiembre et al. 2005) und *Listeria monocytogenes* (Shen et al. 2010). Darüber hinaus konnte TLR2 in den Phagosomen von Makrophagen detektiert werden (Underhill et al. 1999), wo TLR2 vermutlich die Rolle des Antigen-*“Samplings”* übernimmt. Somit können die aufgenommenen Pathogene erkannt, und eine entsprechende Immunantwort

ausgelöst werden. Es wäre denkbar, dass die Phagocytose-Effektivität von Makrophagen im vorliegenden TLR2/MDR1A dKO-Colitismodell durch die TLR2-Defizienz herabgesetzt ist und Bakterien damit nur ungenügend beseitigt werden.

Die Tatsache, dass TLR2 zelltypspezifische Unterschiede bei der Aktivierung aufweist, zeigt die Limitation des vorliegenden TLR2/MDR1A dKO-Modells auf. TLR2 und MDR1A sind hierbei sowohl in allen Epithelzellen als auch in allen hämatopoetischen Zellen des gesamten Organismus deletiert. Somit kann in dieser Arbeit nicht eindeutig festgestellt werden, welcher Zelltyp für die Colitisentwicklung mechanistisch entscheidend ist. Interessant wäre es in der Zukunft einen zelltypspezifischen KO zu generieren, bei dem TLR2 und MDR1A z.B. nur im intestinalen Epithel deletiert sind. Damit könnte man die Rolle des Epithels in der Colitispathogenese bei TLR2/MDR1A-Defizienz untersuchen. Alternativ könnten Knochenmarks(KM)-Transplantations-Versuche durchgeführt werden, um das verantwortliche Zellkompartiment (hämatopoetisch vs. nicht-hämatopoetisch) zu identifizieren. Allerdings kommt es bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen bereits früh zur Morbidität und die Bestrahlung wäre daher wahrscheinlich mit hoher Mortalität verbunden. KM-Transplantationsversuche wären somit in diesem Modell wahrscheinlich nicht praktikabel.

Alle TLRs (außer TLR3) signalisieren durch das Adapterprotein MyD88. Um die Rolle von MyD88-abhängiger TLR-Signalisierung in MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäusen im Allgemeinen zu untersuchen, wurden MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäuse generiert und analysiert. Die Deletion von MyD88 verhinderte die klinische und histologische Colitisentwicklung sowohl in MDR1A KO- als auch in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen. So verhinderte die MyD88-Defizienz in MDR1A KO die Diarrhoeentwicklung und in TLR2/MDR1A dKO sowohl die Diarrhoeentwicklung als auch die Verkürzung der Colonlänge. Histologisch waren keine Anzeichen einer Colitis bei MyD88/MDR1A dKO- und TLR2/MyD88/MDR1A tKO-Mäusen zu erkennen. Die MyD88-Deletion verhinderte in beiden Genotypen das Einwandern von inflammatorischen CD11b-dominanten Infiltraten in die intestinale LP und die Th1-Polarisierung auf mRNA-Ebene. Diese Daten legen nahe, dass die Colitisentwicklung und -progression in MDR1A KO- und in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen MyD88-abhängig erfolgt.

Verschiedene Studien haben sich mit der Rolle von MyD88 in der Colitispathogenese beschäftigt, allerdings je nach Colitismodell und dominantem Zelltyp mit unterschiedlichen Ergebnissen: während die Deletion von MyD88 in IL-2 KO-Mäusen keine Auswirkungen auf die Colitisentwicklung hat, verhindert die MyD88-Defizienz die Spontancolitis in IL-10 KO-Mäusen (Rakoff-Nahoum et al. 2006). Die pathologische Rolle von MyD88 ist hierbei auf die mukosalen Immunzellen zurückzuführen, nicht aber auf das Epithel (Karrasch et al. 2007). Auch im *Helicobacter*-Infektionsmodell konnte eine pathologische Rolle von MyD88 auf hämatopoetischen Zellen bei der Colitisentwicklung nachgewiesen werden (Asquith et al. 2010). Im *akuten* DSS-Colitismodell konnte dagegen eine protektive Rolle für MyD88 im intestinalen Epithel gezeigt werden. So führt MyD88-Defizienz zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber der DSS-induzierten Colitis (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Araki et al. 2005; Fukata et al. 2005; Cario et al. 2007).

Unterschiedliche Ergebnisse zur Rolle von MyD88 wurden im T-Zell-Transfer-Colitismodell generiert. Somit lösten in einigen Studien MyD88-defiziente CD4⁺CD45RB^{hi} Zellen eine mildere Colitis bei Transfer in RAG1 KO- (Fukata et al. 2005) und RAG2 KO-Mäuse (Tomita et al. 2008) aus, als in Anwesenheit von MyD88. Des Weiteren war das Proliferationsvermögen der CD4⁺-Zellen in Abwesenheit von MyD88 eingeschränkt. Im Gegensatz dazu, zeigten Asquith et al, dass MyD88 keine Rolle in der T-zell-abhängigen *Helicobacter hepaticus*-getriggerten Colitis spielt (Asquith et al. 2010). Demnach lösten MyD88-defiziente und WT-CD45RB^{hi} T-Zellen bei Transfer in RAG1 KO-Mäuse Colitis zu gleichem Grade aus. Asquith et al. spekulierten, dass das pathologische MyD88-Signal in ihrem Infektionsmodell nicht von T-Zellen, sondern von myeloischen Zellen, wahrscheinlich dendritischen Zellen, ausgehen könnte.

Wie TLR2 scheint MyD88 je nach Zelltyp unterschiedliche Funktionen zu übernehmen. Während es im Epithel eine protektive Rolle zu haben scheint (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Fukata et al. 2005; Brown et al. 2007; Cario et al. 2007; Brandl et al. 2010), ist die Aktivierung von MyD88 auf hämatopoetischen Zellen eher pathologisch (Asquith et al. 2010; Jobin 2010). MyD88 daher als therapeutischen "Target" zellunspezifisch in Angriff zu nehmen, wäre aufgrund seiner ambivalenten Rolle wahrscheinlich nicht der richtige Ansatz.

Eine protektive Rolle von MyD88 konnte auch im Epithel des Dünndarms nachgewiesen werden. Epithel-spezifische MyD88 KO-Mäuse entwickeln eine Entzündung des Dünndarms, die jedoch nicht durch eine primäre Zerstörung der Barriere erfolgt, sondern durch erniedrigte Expression von α -Defensin und RegIII γ . (Gong et al. 2010) Defensine sind antimikrobielle Peptide, die von Paneth-Körnerzellen im Dünndarm produziert werden. CD-Ileitis wurde mit einer fehlregulierten Defensinproduktion assoziiert (Wehkamp et al. 2005). Eine veränderte Defensinproduktion war bei den TLR2/MDR1A dKO-Mäusen in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festzustellen. MDR1A KO- und TLR2/MDR1A dKO-Mäuse zeigten, zumindest auf mRNA-Ebene, keine veränderte Defensinexpression im Vergleich zu WT-Mäusen. Dies wurde jedoch nicht weiter auf Proteinebene untersucht. Somit kann eine Fehlregulation von Defensinen im vorliegenden Mausmodell auf posttranslationaler Ebene nicht ausgeschlossen werden.

Nicht nur TLRs sondern auch IL-1R signalisiert über das Adapterprotein MyD88. Dieser Signalweg ist vermutlich in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen aktiv, da bereits früh eine erhöhte IL-1 β -Produktion nachweisbar war. Um die mechanistische Rolle des MyD88-abhängigen IL-1R-Signalweges in der Colitispathogenese zu untersuchen, wurden TLR2/MDR1A dKO-Mäuse mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra behandelt. Anakinra neutralisiert das IL-1 β -Signal, indem es mit endogenem IL-1 β und endogenem IL-1R-Antagonisten um den IL-1R konkurriert (Cohen et al. 2002; Rubbert-Roth und Perniok 2003). Die Blockade des IL-1 β Signals in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen durch die Behandlung mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra führte zu einer Milderung der Colitis. Dies war klinisch durch eine überwiegende Verhinderung der Diarrhoeentwicklung und der Colonlängenreduktion gekennzeichnet. Histologisch war eine geringere Zahl an inflammatorischen Infiltraten in der intestinalen LP zu finden. Die IL-12-mRNA-Expression war nach Behandlung mit dem IL-1R-Antagonisten deutlich reduziert. Dennoch blieben alle anderen Th1-Zytokine auf mRNA-Ebene und die Zahl an rekrutierten CD11b $^{+}$ Zellen weiterhin erhöht.

IL-1 β spielt als proinflammatorisches Zytokin eine bedeutende Rolle in vielen Erkrankungen, u.a. bei Sepsis, Arthritis, Organabstoßungen, Artherosklerose, Psoriasis und CED (Dinarello und Wolff 1993). Anakinra, welches die IL-1 β -Signalisierung blockiert, wurde bisher als Therapeutikum erfolgreich nur bei Patienten mit Psoriasis und Rheumatoider Arthritis eingesetzt (Cohen et al. 2002;

Viguier et al. 2010), nicht jedoch bei CED. Eine erhöhte IL-1 β -Produktion ist sowohl bei entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen (Mahida et al. 1989; Reinecker et al. 1993) als auch bei murinen Colitismodellen (Arai et al. 1998) nachweisbar. Daher wäre die Neutralisierung von IL-1 β ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt bei CED.

Studien hierzu zeigen jedoch je nach murinem Colitismodell unterschiedliche Auswirkungen. Im DSS-induzierten Colitismodell führte die Deletion von IL-1R oder die Behandlung mit Anakinra zu einer Verschlimmerung der Colitis (Gonzalez-Navajas et al. 2010), welches auf eine protektive Rolle von IL-1 β hindeutet. Im Gegensatz dazu konnte eine pathologische Rolle von IL-1 β bei TLR5-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, bei denen Colitis durch die Blockade von IL-10 induziert wurde (Carvalho et al. 2011). Somit entwickelten TLR5/IL-1 β dKO-Mäuse im Gegensatz zu TLR5 KO-Mäusen nach Blockade von IL-10 keine Colitis. Jedoch war die Inhibierung des IL-1 β -Signals durch die Behandlung mit Anakinra bei TLR5 KO-Mäusen mit Colitis nicht erfolgreich. Trotz Anakinra-Behandlung entwickelten die Mäuse weiterhin Colitis. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Einerseits könnte die Dosis mit 25mg/kg Körpergewicht zu gering gewesen sein. Die in der vorliegenden Arbeit erfolgreich verwendete Dosis war 100mg/kg Körpergewicht, wie sie bereits in anderen Studien verwendet wurde (Abbate et al. 2008; Lacraz et al. 2009). Des Weiteren wurde der IL-1R-Antagonist Anakinra in der vorliegenden Studie den Mäusen täglich subkutan verabreicht, während Carvalho et al. die Mäuse lediglich drei Mal pro Woche subkutan behandelten.

IL-1 β wird zunächst in einer unreifen Form synthetisiert. Erst nach Spaltung durch das Enzym Caspase-1 wird es in die aktive Form umgewandelt, die dann sekretiert wird. Caspase-1 ist Teil eines großen Proteinkomplexes, der als Inflammasom bezeichnet wird (Martinon et al. 2002; Dinarello 2011). Durch Zusammenlagerung der verschiedenen Proteine/Enzyme (u.a. ASC/Pycard, Nlrp3, Caspase-1) kommt es zu einer Reihe an Proteinspaltungen, die schließlich in der Aktivierung von Caspase-1 und der Umwandlung von pro-IL-1 β in die reife Form von IL-1 β führen.

Variationen im Nlrp3-Gen wurden vor kurzem mit erhöhter Suszeptibilität für MC assoziiert (Villani et al. 2009) und auch in Mäusen scheint der Verlauf der Colitis durch Proteine des Inflammasoms moduliert zu werden. Bauer et al. konnten zeigen, dass Makrophagen von Nlrp3 KO-, ASC KO- oder Caspase-1 KO-Mäusen weniger

IL-1 β produzierten und Nlrp3 KO-Mäuse eine mildere DSS-induzierte Colitis entwickelten (Bauer et al. 2010). Gegenteilige Ergebnisse wurden in anderen Studien generiert. Somit entwickelten ASC KO-, Caspase-1 KO- und Nlrp3 KO-Mäuse eine schlimmere DSS-induzierte Colitis (Allen et al. 2010; Zaki et al. 2010; Hirota et al. 2011). Dabei war der protektive Effekt von Nlrp3 auf die Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückzuführen.

IL-1 β wird v.a. von aktivierten Monozyten/Makrophagen produziert und kann einerseits zur Expansion von CD4⁺-T-Zellen führen (Ben-Sasson et al. 2009; Dinarello 2011), andererseits wirkt es "*autokrin*" und kann seine eigene Produktion durch Bindung an IL-1R erhöhen (Dinarello et al. 1987). Im vorliegenden TLR2/MDR1A dKO-Colitismodell war die Anakinra-Therapie nicht vollständig wirksam und milderte die Colitis lediglich ab. Dies könnte daran liegen, dass Anakinra erst sehr weit "*downstream*" in den Signalweg eingreift. Die Rekrutierung von Immunzellen wird durch die Anakinra-Behandlung nicht beeinflusst, lediglich der "*autokrine Loop*" der IL-1 β -Produktion wird verhindert. Somit wird die inflammatorische Antwort abgeschwächt, aber nicht vollständig verhindert.

In der vorliegenden Arbeit war neben dem Th1-Zytokin IL-1 β auch die IL-12-mRNA bereits früh im Colongewebe von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen erhöht und korrelierte mit der Anwesenheit von inflammatorischen Infiltraten in der intestinalen LP. Isolierte T-Zellen aus der intestinalen LP von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen zeigten im basalen Zustand eine erhöhte Expression von IL-12 und diversen Chemokinen, welches auf eine Hyperreaktivität dieser Zellen deutete.

Eine Zusammenfassung des hypothetischen Modells zur TLR2/MDR1A dKO-Colitis aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist in **Abb. 4.1** dargestellt und erläutert.

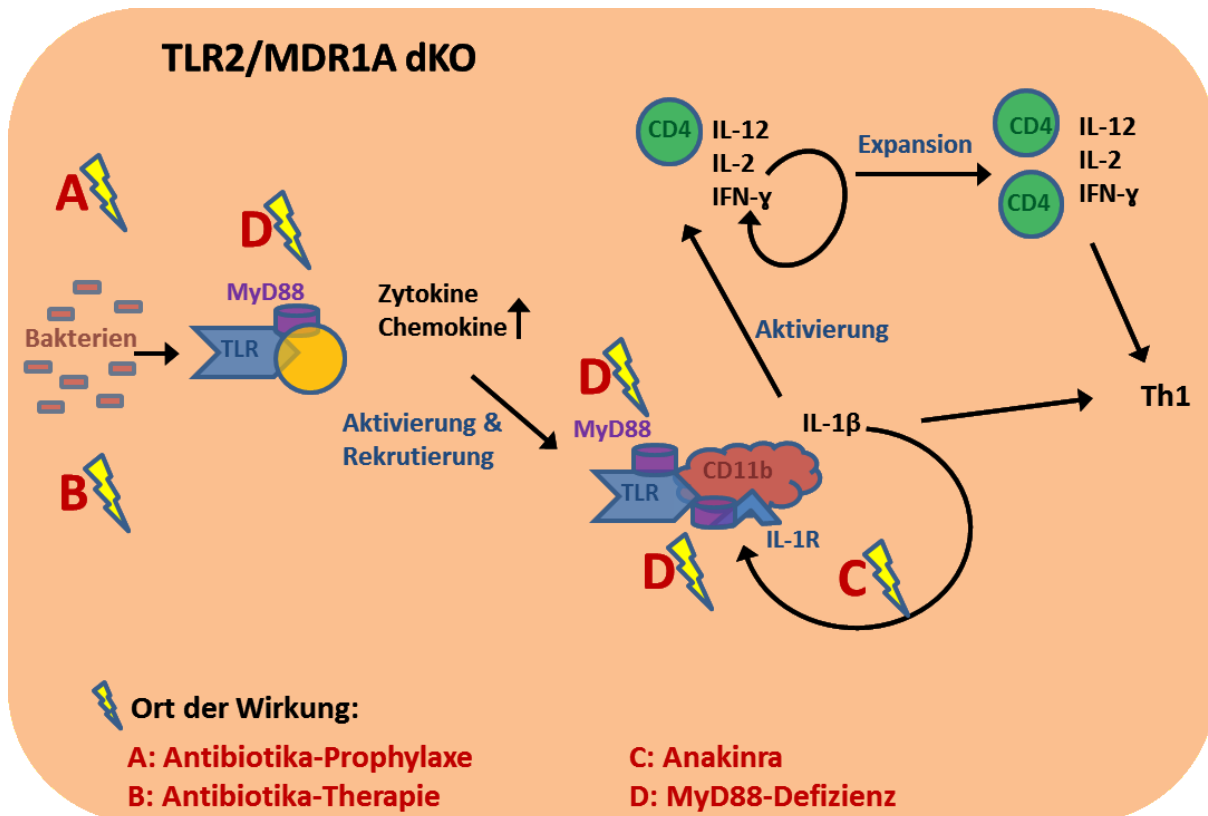


Abb. 4.1 Mögliche Mechanismen der TLR2/MDR1A dKO-Colitis.

Bei TLR2/MDR1A-Doppel-Defizienz kommt es zur Rekrutierung von Immunzellen, v.a. CD11b+-Zellen, und zu deren Aktivierung. CD11b+-Zellen produzieren vermehrt IL-1β, das einerseits T-Zellen aktivieren kann und andererseits in einem „autokrinen Loop“ für weitere IL-1β-Produktion sorgt. T-Zellen produzieren vermehrt die Th1-Zytokine IL-2, IL-12 und IFN-γ und es kommt zur Expansion der CD4+-T-Zellpopulation. Ob die vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen durch eine höhere Aktivierung anderer TLRs, wie TLR4, zustande kommt, müssen zukünftige Versuche klären.

Prophylaktische Antibiotika-Behandlung greift unmittelbar am Anfang der Ereignisse ein und entfernt den Reiz (Bakterien), der zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen führt. Somit bleibt eine Entzündung des Darms aus (A).

Therapeutische Antibiotika-Behandlung entfernt den Reiz (Bakterien), nachdem bereits Immunzellen rekrutiert und aktiviert wurden. Es kommt zu keiner weiteren Rekrutierung von CD11b+-Zellen, aber residuale CD4+-T-Zellen bleiben in der LP des Colons vorhanden. Daher sind die Th1-Zytokine IL-12, IL-2 und IFN-γ weiterhin nachweisbar, nicht aber IL-1β (B).

Anakinra-Behandlung greift „downstream“ in die Ereignisse ein. Anakinra blockiert den IL-1R und verhindert so die Wirkung von IL-1β. Dadurch wird die Immunantwort bzw. die mukosale Inflammation abgeschwächt (C).

MyD88-Defizienz greift an mehreren Stellen gleichzeitig in die Ereignisse ein. Eine Erkennung der bakteriellen Antigene über TLRs kann nicht erfolgen und auch der IL-1R-Signalweg wird blockiert. Damit kommt es zu keiner Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen. Somit bleibt eine Entzündung des Darms aus (D).

Das Th1-Zytokin IL-12 ist sowohl in Patienten mit MC (Fuss et al. 2006) als auch in einigen murinen Colitismodellen erhöht und bietet einen Ansatzpunkt für Therapiemöglichkeiten. So konnte gezeigt werden, dass IL-12-neutralisierende Antikörper die Colitis im DSS-Modell (Sadakane et al. 2010), im TNBS-Colitis-Modell (Neurath et al. 1995; Duchmann et al. 1996) und zum Teil auch im IL-10 KO-Modell (Spencer et al. 2002) verhindern können. IL-12 ist ein Zytokin, das wichtig für die Aufrechterhaltung einer Th1-Immunantwort ist (Trinchieri 1993; Kubin et al. 1994; Trinchieri 1994) und kann eine schädigende Wirkung auf Gewebe haben (Monteleone et al. 1999). Die Blockade von IL-12 durch Behandlung mit IL-12-neutralisierenden Antikörpern könnte möglicherweise auch die Colitis in TLR2/MDR1A dKO-Mäusen mildern. Die Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen Th1-Zytokine wie IL-12 und TNF- α sind bereits Teil der Therapiemaßnahmen bei CED-Patienten (Holtmann et al. 2002; Abraham und Cho 2009; Blonski et al. 2011).

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Assoziation von CU und Polymorphismen verschiedener Gene beschäftigt. Die R753Q-Genvariante des TLR2, für die 3-10% der kaukasischen Bevölkerung heterozygot sind (Schroder et al. 2003), führt zu Wundheilungsstörungen (Ey et al. 2009) und ist mit einem besonders schweren Phänotyp der CU assoziiert worden (Pierik et al. 2006). Es existieren auch einige Studien zur Assoziation zwischen Polymorphismen im ABCB1/MDR1-Gen und CU, jedoch mit kontroversen Ergebnissen. Während ein Teil der Studien eine klare Assoziation zwischen dem C3435T Polymorphismus und schwerer CU feststellen konnte (Schwab et al. 2003; Ho et al. 2005; Ho et al. 2006), konnte dies in anderen Populationen nicht reproduziert werden (Brant et al. 2003; Croucher et al. 2003; Glas et al. 2004; Potocnik et al. 2004; Palmieri et al. 2005). Bis jetzt existieren jedoch keine Studien dazu, ob Patienten mit besonders schwerem Phänotyp der CU gleichzeitig Mutationen im ABCB1/MDR1A-Gen als auch im TLR2-Gen aufweisen. Es wäre denkbar, dass die Kombination dieser zwei Mutationen zu einer fulminanteren Pancolitis Ulcerosa führt.

Die vorliegende Arbeit zusammen mit Studien an weiteren Colitismodellen zeigt eine protektive Rolle von TLR2. Die Aktivierung von TLR2 könnte daher ein potentielles therapeutisches Ziel bei CED darstellen. Einige TLR-Liganden zeigen bereits vielversprechende Erfolge u.a. in der Behandlung von malignen Tumoren und viralen

Infektionen (Kanzler et al. 2007), jedoch ist der TLR2-Ligand PCSK noch nicht als Therapeutikum beim Menschen eingesetzt worden. Neben den positiven Effekten von TLR2 auf das Epithel, kann nicht ausgeschlossen werden, dass TLR2-Stimulierung zu erhöhter Aktivierung von Immunzellen in der LP und dadurch zu einer pathologischen Entzündungsreaktion führen könnte. Auch in der Tumorbildung ist die Rolle von TLR2 umstritten. Während TLR2 im AOM-DSS-Modell für Colitis-assoziiertes Colonkarzinom eine protektive Rolle gegenüber der Tumorbildung hat (Lowe et al. 2010), konnten Kim et al. zeigen, dass TLR2 die Entstehung von Lewis-Lungenkarzinom fördert (Kim et al. 2009). Mögliche Nebenwirkungen bei PCSK-Behandlung sind bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht worden. Dennoch repräsentiert TLR2 einen potentiellen zukünftigen Angriffspunkt zur therapeutischen Behandlung von humaner CU.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Genetische Variationen des humanen ABCB1/MDR1-Gens sind mit erhöhter Suszeptibilität für CU assoziiert und MDR1A-defiziente Mäuse entwickeln eine CU-ähnliche, chronische Spontancolitis. Bis jetzt ist die Rolle des angeborenen Immunsystems, im speziellen der TLRs, in der Colitispathogenese bei MDR1A-Defizienz noch nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass TLR2 bei MDR1A-defizienter Colitis eine protektive Funktion ausübt:

Deletion von TLR2 führte zu einer deutlichen Exazerbation der Colitis, während Stimulation von TLR2 die Colitisentwicklung bei MDR1A KO-Mäusen verzögerte.

Doppel-Defizienz von TLR2 und MDR1A führte zu frühzeitiger Rekrutierung von Immunzellen in die intestinale LP und zu Th1-vermittelter Immunantwort. Der dominante Zelltyp in der entzündeten intestinalen Mukosa von TLR2/MDR1A dKO-Mäusen waren CD11b⁺-Zellen, die als Hauptquelle für die IL-1 β -Produktion identifiziert werden konnten.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MDR1A-defiziente Makrophagen auf LPS-Stimulation in Abwesenheit von TLR2 mit übermäßiger Produktion von IL-1 β reagierten. Auch TLR2/MDR1A doppel-defiziente intestinale T-Zellen wiesen eine Hyperreaktivität auf, die mit erhöhter basaler IL-12-Produktion assoziiert war.

Die Colitisentwicklung bei TLR2/MDR1A dKO-Mäusen erfolgte kommensal-abhängig und konnte durch *prophylaktische* Antibiose vollständig verhindert werden. *Therapeutische* Antibiose milderte die Colitis deutlich ab, aber die Th1-Polarisierung in der intestinalen Mukosa war trotz Behandlung nicht komplett reversibel.

Die TLR2/MDR1A dKO-Colitis erfolgte vollständig MyD88-abhängig und zum Teil IL-1R-abhängig.

Die Daten dieser Studie legen nahe, dass TLR2 durch seine mukosa-protektive Funktion ein mögliches Ziel zur therapeutischen Behandlung von humaner CU darstellen könnte.

6 Summary and future perspective

Genetic variations of the human ABCB1/MDR1 gene have been associated with increased susceptibility to ulcerative colitis (UC) and MDR1A-deficient mice develop a spontaneous colitis, which resembles UC in humans. Until now the role of the innate immune system, specifically of TLRs, in the pathogenesis of MDR1A-deficient colitis remains to be elucidated.

This study is the first to show, that TLR2 has a protective function in MDR1A KO colitis:

Deletion of TLR2 led to a more fulminant colitis, while activation of TLR2 delayed the onset of colitis development in MDR1A KO mice.

TLR2/MDR1A double deficiency led to an early recruitment of immune cells into the intestinal LP and a shift towards a Th1-immune response. The dominating cell type in the inflamed mucosa of TLR2/MDR1A dKO mice were CD11b⁺ cells. These cells were identified as the major source for IL-1 β production.

Furthermore this study demonstrated that MDR1A-deficient macrophages showed an overproduction of IL-1 β in response to LPS-stimulation in the absence of TLR2. Intestinal T-cells also displayed a hyperreactivity, which was reflected by an increased basal production of IL-12.

The colitis development of TLR2/MDR1A dKO mice was commensal-dependent, as it was completely inhibited by prophylactic antibiotic treatment. Therapeutic antibiotic treatment ameliorated colitis but was not able to completely reverse the Th1-polarization.

The TLR2/MDR1A dKO colitis was fully MyD88-dependent and in part dependent upon IL-1R-signaling.

Because of its mucosa-protective function, TLR2 could represent a potential future target for therapy of ulcerative colitis.

7 Literaturverzeichnis

- Abbate, A., Salloum, F. N., Vecile, E., Das, A., Hoke, N. N., Straino, S., Biondi-Zoccai, G. G., Houser, J. E., Qureshi, I. Z., Ownby, E. D., Gustini, E., Biasucci, L. M., Severino, A., Capogrossi, M. C., Vetrove, G. W., Crea, F., Baldi, A., Kukreja, R. C. und Dobrina, A. (2008). "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction." Circulation **117**(20): 2670-83.
- Abraham, C. und Cho, J. H. (2009). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **361**(21): 2066-78.
- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." Nat Rev Immunol **10**(2): 131-44.
- Albert, E. J. und Marshall, J. S. (2008). "Aging in the absence of TLR2 is associated with reduced IFN-gamma responses in the large intestine and increased severity of induced colitis." J Leukoc Biol **83**(4): 833-42.
- Allen, I. C., TeKippe, E. M., Woodford, R. M., Uronis, J. M., Holl, E. K., Rogers, A. B., Herfarth, H. H., Jobin, C. und Ting, J. P. (2010). "The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer." J Exp Med **207**(5): 1045-56.
- Annese, V., Valvano, M. R., Palmieri, O., Latiano, A., Bossa, F. und Andriulli, A. (2006). "Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis." World J Gastroenterol **12**(23): 3636-44.
- Arai, Y., Takanashi, H., Kitagawa, H. und Okayasu, I. (1998). "Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice." Cytokine **10**(11): 890-6.
- Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S. und Watanabe, M. (2005). "MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis." J Gastroenterol **40**(1): 16-23.
- Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." Nat Rev Immunol **8**(6): 411-20.
- Asquith, M. J., Boulard, O., Powrie, F. und Maloy, K. J. (2010). "Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **139**(2): 519-29, 529 e1-2.
- Bauer, C., Duell, P., Mayer, C., Lehr, H. A., Fitzgerald, K. A., Dauer, M., Tschopp, J., Endres, S., Latz, E. und Schnurr, M. (2010). "Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome." Gut **59**(9): 1192-9.
- Ben-Sasson, S. Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A. und Paul, W. E. (2009). "IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7119-24.
- Blokzijl, H., Vander Borgh, S., Bok, L. I., Libbrecht, L., Geuken, M., van den Heuvel, F. A., Dijkstra, G., Roskams, T. A., Moshage, H., Jansen, P. L. und Faber, K. N. (2007). "Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels." Inflamm Bowel Dis **13**(6): 710-20.

- Blonski, W., Buchner, A. M. und Lichtenstein, G. R. (2011). "Inflammatory bowel disease therapy: current state-of-the-art." Curr Opin Gastroenterol **27**(4): 346-57.
- Boulard, O., Asquith, M. J., Powrie, F. und Maloy, K. J. (2010). "TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation." Eur J Immunol **40**(2): 516-24.
- Brandl, K., Plitas, G., Mihu, C. N., Ubeda, C., Jia, T., Fleisher, M., Schnabl, B., DeMatteo, R. P. und Pamer, E. G. (2008). "Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits." Nature **455**(7214): 804-7.
- Brandl, K., Sun, L., Neppl, C., Siggs, O. M., Le Gall, S. M., Tomisato, W., Li, X., Du, X., Maennel, D. N., Blobel, C. P. und Beutler, B. (2010). "MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(46): 19967-72.
- Brant, S. R., Panhuysen, C. I., Nicolae, D., Reddy, D. M., Bonen, D. K., Karaliukas, R., Zhang, L., Swanson, E., Datta, L. W., Moran, T., Ravenhill, G., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Karban, A. S. und Cho, J. H. (2003). "MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease." Am J Hum Genet **73**(6): 1282-92.
- Brown, S. L., Riehl, T. E., Walker, M. R., Geske, M. J., Doherty, J. M., Stenson, W. F. und Stappenbeck, T. S. (2007). "Myd88-dependent positioning of Ptg2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury." J Clin Invest **117**(1): 258-69.
- Burke, D. A., Axon, A. T., Clayden, S. A., Dixon, M. F., Johnston, D. und Lacey, R. W. (1990). "The efficacy of tobramycin in the treatment of ulcerative colitis." Aliment Pharmacol Ther **4**(2): 123-9.
- Cario, E. (2005). "Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2." Gut **54**(8): 1182-93.
- Cario, E. (2008). "Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S62-6.
- Cario, E. (2010a). "Heads up! How the intestinal epithelium safeguards mucosal barrier immunity through the inflammasome and beyond." Curr Opin Gastroenterol **26**(6): 583-90.
- Cario, E. (2010b). "Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later." Inflamm Bowel Dis **16**(9): 1583-97.
- Cario, E., Gerken, G. und Podolsky, D. K. (2004). "Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C." Gastroenterology **127**(1): 224-38.
- Cario, E., Gerken, G. und Podolsky, D. K. (2007). "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." Gastroenterology **132**(4): 1359-74.
- Cario, E. und Podolsky, D. K. (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7.
- Cario, E. und Podolsky, D. K. (2005). "Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals." Mol Immunol **42**(8): 887-93.
- Carmeli, Y., Eliopoulos, G., Mozaffari, E. und Samore, M. (2002). "Health and economic outcomes of vancomycin-resistant enterococci." Arch Intern Med **162**(19): 2223-8.
- Carvalho, F. A., Nalbantoglu, I., Ortega-Fernandez, S., Aitken, J. D., Su, Y., Koren, O., Walters, W. A., Knight, R., Ley, R. E., Vijay-Kumar, M. und Gewirtz, A. T.

- (2011). "Interleukin-1{beta} (IL-1{beta}) promotes susceptibility of Toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis." Gut.
- Chapman, R. W., Selby, W. S. und Jewell, D. P. (1986). "Controlled trial of intravenous metronidazole as an adjunct to corticosteroids in severe ulcerative colitis." Gut **27**(10): 1210-2.
- Cohen, S., Hurd, E., Cush, J., Schiff, M., Weinblatt, M. E., Moreland, L. W., Kremer, J., Bear, M. B., Rich, W. J. und McCabe, D. (2002). "Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **46**(3): 614-24.
- Collett, A., Higgs, N. B., Gironella, M., Zeef, L. A., Hayes, A., Salmo, E., Haboubi, N., Iovanna, J. L., Carlson, G. L. und Warhurst, G. (2008). "Early molecular and functional changes in colonic epithelium that precede increased gut permeability during colitis development in *mdr1a*(-/-) mice." Inflamm Bowel Dis **14**(5): 620-31.
- Contractor, N. V., Bassiri, H., Reya, T., Park, A. Y., Baumgart, D. C., Wasik, M. A., Emerson, S. G. und Carding, S. R. (1998). "Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice." J Immunol **160**(1): 385-94.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. und Bertino, J. R. (1989). "Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 695-8.
- Croucher, P. J., Mascheretti, S., Foelsch, U. R., Hampe, J. und Schreiber, S. (2003). "Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations." Gastroenterology **125**(6): 1919-20; author reply 1920-1.
- Dean, M., Rzhetsky, A. und Allikmets, R. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- Dinarello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." Blood **117**(14): 3720-32.
- Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G. und Libby, P. (1987). "Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro." J Immunol **139**(6): 1902-10.
- Dinarello, C. A. und Wolff, S. M. (1993). "The role of interleukin-1 in disease." N Engl J Med **328**(2): 106-13.
- Duchmann, R., Schmitt, E., Knolle, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Neurath, M. (1996). "Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12." Eur J Immunol **26**(4): 934-8.
- Eckmann, L., Jung, H. C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E. und Kagnoff, M. F. (1993). "Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8." Gastroenterology **105**(6): 1689-97.
- Eckmann, L., Kagnoff, M. F. und Fierer, J. (1995). "Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system." Trends Microbiol **3**(3): 118-20.

- Ey, B., Eyking, A., Gerken, G., Podolsky, D. K. und Cario, E. (2009). "TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury." J Biol Chem **284**(33): 22332-43.
- Fukata, M., Michelsen, K. S., Eri, R., Thomas, L. S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C. C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M. und Abreu, M. T. (2005). "Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(5): G1055-65.
- Fuss, I. J., Becker, C., Yang, Z., Groden, C., Hornung, R. L., Heller, F., Neurath, M. F., Strober, W. und Mannon, P. J. (2006). "Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 9-15.
- Gibson, D. L., Ma, C., Rosenberger, C. M., Bergstrom, K. S., Valdez, Y., Huang, J. T., Khan, M. A. und Vallance, B. A. (2008). "Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis." Cell Microbiol **10**(2): 388-403.
- Glas, J., Torok, H. P., Schiemann, U. und Folwaczny, C. (2004). "MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis." Gastroenterology **126**(1): 367.
- Gong, J., Xu, J., Zhu, W., Gao, X., Li, N. und Li, J. (2010). "Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation." Clin Immunol **136**(2): 245-56.
- Gonzalez-Navajas, J. M., Law, J., Nguyen, K. P., Bhargava, M., Corr, M. P., Varki, N., Eckmann, L., Hoffman, H. M., Lee, J. und Raz, E. (2010). "Interleukin 1 receptor signaling regulates DUBA expression and facilitates Toll-like receptor 9-driven antiinflammatory cytokine production." J Exp Med **207**(13): 2799-807.
- Hirota, S. A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., Lam, V., Potentier, M. S., Ng, K., Bawa, M., McCafferty, D. M., Rioux, K. P., Ghosh, S., Xavier, R. J., Colgan, S. P., Tschopp, J., Muruve, D., MacDonald, J. A. und Beck, P. L. (2011). "NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis." Inflamm Bowel Dis **17**(6): 1359-72.
- Ho, G. T., Moodie, F. M. und Satsangi, J. (2003). "Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?" Gut **52**(5): 759-66.
- Ho, G. T., Nimmo, E. R., Tenesa, A., Fennell, J., Drummond, H., Mowat, C., Arnott, I. D. und Satsangi, J. (2005). "Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis." Gastroenterology **128**(2): 288-96.
- Ho, G. T., Soranzo, N., Nimmo, E. R., Tenesa, A., Goldstein, D. B. und Satsangi, J. (2006). "ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach." Hum Mol Genet **15**(5): 797-805.
- Holtmann, M., Mudter, J., Galle, P. R. und Neurath, M. F. (2002). "[The mucosal immune system. How clear is the pathophysiology?]." Internist (Berl) **43**(11): 1343-4, 1347-53.
- Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N., Akira, S. und Saito, T. (2007). "Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions." J Immunol **178**(11): 6715-9.
- Ince, A. T., Hatirnaz, O., Ovunc, O. und Ozbek, U. (2008). "1007fs, G908R, R702W mutations and P268S, IVS8+158 polymorphisms of the CARD15 gene in

- Turkish inflammatory bowel disease patients and their relationship with disease-related surgery." Dig Dis Sci **53**(6): 1683-92.
- Itoh, H., Kataoka, H., Tomita, M., Hamasuna, R., Nawa, Y., Kitamura, N. und Kono, M. (2000). "Upregulation of HGF activator inhibitor type 1 but not type 2 along with regeneration of intestinal mucosa." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(4): G635-43.
- Ivanov, I. und Littman, D. R. (2011). "Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria." Curr Opin Microbiol **14**(1): 106-14.
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Jobin, C. (2010). "MyD88 signaling in the intestine: Dr Jekyll and Mr Hyde?" Gastroenterology **139**(2): 383-5.
- Johansson, C. und Kelsall, B. L. (2005). "Phenotype and function of intestinal dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 284-94.
- Kagnoff, M. F. und Eckmann, L. (1997). "Epithelial cells as sensors for microbial infection." J Clin Invest **100**(1): 6-10.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. und Coffman, R. L. (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." Nat Med **13**(5): 552-9.
- Karrasch, T., Kim, J. S., Muhlbauer, M., Magness, S. T. und Jobin, C. (2007). "Gnotobiotic IL-10-/-;NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis." J Immunol **178**(10): 6522-32.
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-84.
- Kawai, T. und Akira, S. (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-50.
- Kellermayer, R., Dowd, S. E., Harris, R. A., Balasa, A., Schaible, T. D., Wolcott, R. D., Tatevian, N., Szigeti, R., Li, Z., Versalovic, J. und Smith, C. W. (2011). "Colonic mucosal DNA methylation, immune response, and microbiome patterns in Toll-like receptor 2-knockout mice." Faseb J **25**(5): 1449-60.
- Khan, K. J., Ullman, T. A., Ford, A. C., Abreu, M. T., Abadir, A., Marshall, J. K., Talley, N. J. und Moayyedi, P. (2011). "Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis." Am J Gastroenterol **106**(4): 661-73.
- Khor, B., Gardet, A. und Xavier, R. J. (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 307-17.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J. L. und Karin, M. (2009). "Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis." Nature **457**(7225): 102-6.
- Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D. und Liew, F. Y. (2004). "TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3029-34.
- Kono, H., Kyogoku, C., Suzuki, T., Tsuchiya, N., Honda, H., Yamamoto, K., Tokunaga, K. und Honda, Z. (2005). "FcgammaRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling." Hum Mol Genet **14**(19): 2881-92.
- Kubin, M., Kamoun, M. und Trinchieri, G. (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells." J Exp Med **180**(1): 211-22.

- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. und Muller, W. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-74.
- Lacraz, G., Giroix, M. H., Kassis, N., Coulaud, J., Galinier, A., Noll, C., Cornut, M., Schmidlin, F., Paul, J. L., Janel, N., Irminger, J. C., Kergoat, M., Portha, B., Donath, M. Y., Ehses, J. A. und Homo-Delarche, F. (2009). "Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat." PLoS One **4**(9): e6963.
- Lampe, P. D., TenBroek, E. M., Burt, J. M., Kurata, W. E., Johnson, R. G. und Lau, A. F. (2000). "Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication." J Cell Biol **149**(7): 1503-12.
- Langmann, T., Moehle, C., Mauerer, R., Scharl, M., Liebisch, G., Zahn, A., Stremmel, W. und Schmitz, G. (2004). "Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes." Gastroenterology **127**(1): 26-40.
- Lencioni, K. C., Seamons, A., Treuting, P. M., Maggio-Price, L. und Brabb, T. (2008). "Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease." Comp Med **58**(6): 522-33.
- Letiembre, M., Echchannaoui, H., Bachmann, P., Ferracin, F., Nieto, C., Espinosa, M. und Landmann, R. (2005). "Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes." Infect Immun **73**(12): 8397-401.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. und Gordon, J. I. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 11070-5.
- Lobo, A. J., Burke, D. A., Sobala, G. M. und Axon, A. T. (1993). "Oral tobramycin in ulcerative colitis: effect on maintenance of remission." Aliment Pharmacol Ther **7**(2): 155-8.
- Lorenz, R. G. und Newberry, R. D. (2004). "Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses." Ann N Y Acad Sci **1029**: 44-57.
- Lowe, E. L., Crother, T. R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., Shimada, K., Wong, M. H., Michelsen, K. S. und Arditi, M. (2010). "Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer." PLoS One **5**(9): e13027.
- Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C. und Rollins, B. J. (1998). "Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice." J Exp Med **187**(4): 601-8.
- Lucke, K., Miehlike, S., Jacobs, E. und Schuppler, M. (2006). "Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. in ulcerative colitis." J Med Microbiol **55**(Pt 5): 617-24.
- MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C. und Monteleone, G. (2011). "Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine." Gastroenterology **140**(6): 1768-75.
- Maggio-Price, L., Shows, D., Waggle, K., Burich, A., Zeng, W., Escobar, S., Morrissey, P. und Viney, J. L. (2002). "Helicobacter bilis infection accelerates and H. hepaticus infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (mdr1a-/-) mice." Am J Pathol **160**(2): 739-51.
- Mahida, Y. R., Wu, K. und Jewell, D. P. (1989). "Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease." Gut **30**(6): 835-8.

- Mantzaris, G. J., Hatzis, A., Kontogiannis, P. und Triadaphyllou, G. (1994). "Intravenous tobramycin and metronidazole as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis." Am J Gastroenterol **89**(1): 43-6.
- Mantzaris, G. J., Petraki, K., Archavlis, E., Amberiadis, P., Kourteas, D., Christidou, A. und Triantafyllou, G. (2001). "A prospective randomized controlled trial of intravenous ciprofloxacin as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis." Scand J Gastroenterol **36**(9): 971-4.
- Martinon, F., Burns, K. und Tschopp, J. (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-26.
- Masunaga, Y., Noto, T., Suzuki, K., Takahashi, K., Shimizu, Y. und Morokata, T. (2007). "Expression profiles of cytokines and chemokines in murine MDR1a/- colitis." Inflamm Res **56**(11): 439-46.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-26.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." Science **296**(5566): 298-300.
- Mercado-Lubo, R. und McCormick, B. A. (2010). "The interaction of gut microbes with host ABC transporters." Gut Microbes **1**(5): 301-306.
- Mizoguchi, A. und Mizoguchi, E. (2010). "Animal models of IBD: linkage to human disease." Curr Opin Pharmacol **10**(5): 578-87.
- Monteleone, G., MacDonald, T. T., Wathen, N. C., Pallone, F. und Pender, S. L. (1999). "Enhancing Lamina propria Th1 cell responses with interleukin 12 produces severe tissue injury." Gastroenterology **117**(5): 1069-77.
- Neudeck, B. L., Loeb, J. M., Faith, N. G. und Czubrynski, C. J. (2004). "Intestinal P glycoprotein acts as a natural defense mechanism against *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **72**(7): 3849-54.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E. und Strober, W. (1995). "Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice." J Exp Med **182**(5): 1281-90.
- Nguyen, D. D., Maillard, M. H., Cotta-de-Almeida, V., Mizoguchi, E., Klein, C., Fuss, I., Nagler, C., Mizoguchi, A., Bhan, A. K. und Snapper, S. B. (2007). "Lymphocyte-dependent and Th2 cytokine-associated colitis in mice deficient in Wiskott-Aldrich syndrome protein." Gastroenterology **133**(4): 1188-97.
- Niederer, H. A., Clatworthy, M. R., Willcocks, L. C. und Smith, K. G. (2010). "FcgammaRIIB, FcgammaRIIIB, and systemic lupus erythematosus." Ann N Y Acad Sci **1183**: 69-88.
- Nones, K., Knoch, B., Dommels, Y. E., Paturi, G., Butts, C., McNabb, W. C. und Roy, N. C. (2009). "Multidrug resistance gene deficient (*mdr1a*^{-/-}) mice have an altered caecal microbiota that precedes the onset of intestinal inflammation." J Appl Microbiol **107**(2): 557-66.
- Ohkusa, T., Nomura, T., Terai, T., Miwa, H., Kobayashi, O., Hojo, M., Takei, Y., Ogiwara, T., Hirai, S., Okayasu, I. und Sato, N. (2005). "Effectiveness of antibiotic combination therapy in patients with active ulcerative colitis: a randomized, controlled pilot trial with long-term follow-up." Scand J Gastroenterol **40**(11): 1334-42.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. und Nakaya, R. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.
- Olsson, R., Danielsson, A., Jarnerot, G., Lindstrom, E., Loof, L., Rolny, P., Ryden, B. O., Tysk, C. und Wallerstedt, S. (1991). "Prevalence of primary sclerosing

- cholangitis in patients with ulcerative colitis." Gastroenterology **100**(5 Pt 1): 1319-23.
- Ott, C., Obermeier, F., Thieler, S., Kempfner, D., Bauer, A., Scholmerich, J., Rogler, G. und Timmer, A. (2008). "The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study." Eur J Gastroenterol Hepatol **20**(9): 917-23.
- Otte, J. M., Cario, E. und Podolsky, D. K. (2004). "Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells." Gastroenterology **126**(4): 1054-70.
- Palmieri, O., Latiano, A., Valvano, R., D'Inca, R., Vecchi, M., Sturniolo, G. C., Saibeni, S., Bossa, F., Latiano, T., Devoto, M., Andriulli, A. und Annese, V. (2005). "Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients." Aliment Pharmacol Ther **22**(11-12): 1129-38.
- Panwala, C. M., Jones, J. C. und Viney, J. L. (1998). "A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis." J Immunol **161**(10): 5733-44.
- Piao, J. H., Hasegawa, M., Heissig, B., Hattori, K., Takeda, K., Iwakura, Y., Okumura, K., Inohara, N. und Nakano, H. (2011). "Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease." J Biol Chem **286**(20): 17879-88.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P. und Vermeire, S. (2006). "Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 1-8.
- Plevy, S. E. und Targan, S. R. (2011). "Future therapeutic approaches for inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1838-46.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-29.
- Podolsky, D. K., Gerken, G., Eyking, A. und Cario, E. (2009). "Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency." Gastroenterology **137**(1): 209-20.
- Potocnik, U., Ferkolj, I., Glavac, D. und Dean, M. (2004). "Polymorphisms in multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis." Genes Immun **5**(7): 530-9.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B. und Coffman, R. L. (1994). "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells." Immunity **1**(7): 553-62.
- Radtko, F. und Clevers, H. (2005). "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin." Science **307**(5717): 1904-9.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Rezaie, A. und Abdollahi, M. (2007). "A meta-analysis of antibiotic therapy for active ulcerative colitis." Dig Dis Sci **52**(11): 2920-5.
- Rakoff-Nahoum, S., Hao, L. und Medzhitov, R. (2006). "Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis." Immunity **25**(2): 319-29.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. und Medzhitov, R. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." Cell **118**(2): 229-41.
- Rath, H. C., Schultz, M., Freitag, R., Dieleman, L. A., Li, F., Linde, H. J., Scholmerich, J. und Sartor, R. B. (2001). "Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice." Infect Immun **69**(4): 2277-85.

- Re, F. und Strominger, J. L. (2004). "IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells." J Immunol **173**(12): 7548-55.
- Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoeft, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P. und Raedler, A. (1993). "Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." Clin Exp Immunol **94**(1): 174-81.
- Resta-Lenert, S., Smitham, J. und Barrett, K. E. (2005). "Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed mdr1a-/- mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(1): G153-62.
- Richards, T. S., Dunn, C. A., Carter, W. G., Usui, M. L., Olerud, J. E. und Lampe, P. D. (2004). "Protein kinase C spatially and temporally regulates gap junctional communication during human wound repair via phosphorylation of connexin43 on serine368." J Cell Biol **167**(3): 555-62.
- Rubbert-Roth, A. und Perniok, A. (2003). "[Interleukin-1 receptor antagonist anakinra (Kineret) for treatment of rheumatic arthritis]." Z Rheumatol **62**(4): 367-77.
- Sadakane, C., Koseki, J., Inagaki, Y., Hasegawa, Y., Shindo, S., Maruyama, H., Takeda, S., Takeda, H. und Hattori, T. (2010). "TJN-419 improves dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibition of interleukin-12 release." Biol Pharm Bull **33**(1): 84-90.
- Saleh, M. und Elson, C. O. (2011). "Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog." Immunity **34**(3): 293-302.
- Sartor, R. B. (2008a). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **134**(2): 577-94.
- Sartor, R. B. (2008b). "Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16413-4.
- Satsangi, J., Parkes, M., Louis, E., Hashimoto, L., Kato, N., Welsh, K., Terwilliger, J. D., Lathrop, G. M., Bell, J. I. und Jewell, D. P. (1996). "Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12." Nat Genet **14**(2): 199-202.
- Savage, D. C. und Dubos, R. (1968). "Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs." J Exp Med **128**(1): 97-110.
- Schenk, M., Belisle, J. T. und Modlin, R. L. (2009). "TLR2 looks at lipoproteins." Immunity **31**(6): 847-9.
- Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P. und et al. (1994). "Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell **77**(4): 491-502.
- Schroder, N. W., Hermann, C., Hamann, L., Gobel, U. B., Hartung, T. und Schumann, R. R. (2003). "High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR." J Mol Med (Berl) **81**(6): 368-72.
- Schwab, M., Schaeffeler, E., Marx, C., Fromm, M. F., Kaskas, B., Metzler, J., Stange, E., Herfarth, H., Schoelmerich, J., Gregor, M., Walker, S., Cascorbi, I., Roots, I., Brinkmann, U., Zanger, U. M. und Eichelbaum, M. (2003). "Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis." Gastroenterology **124**(1): 26-33.
- Sellon, R. K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L. A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D. M. und Sartor, R. B. (1998). "Resident enteric bacteria are

- necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **66**(11): 5224-31.
- Shen, Y., Kawamura, I., Nomura, T., Tsuchiya, K., Hara, H., Dewamitta, S. R., Sakai, S., Qu, H., Daim, S., Yamamoto, T. und Mitsuyama, M. (2010). "Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages." Infect Immun **78**(6): 2857-67.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J. P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P. und Dore, J. (2009). "Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota." Inflamm Bowel Dis **15**(8): 1183-9.
- Spencer, D. M., Veldman, G. M., Banerjee, S., Willis, J. und Levine, A. D. (2002). "Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice." Gastroenterology **122**(1): 94-105.
- Staley, E. M., Schoeb, T. R. und Lorenz, R. G. (2009). "Differential susceptibility of P-glycoprotein deficient mice to colitis induction by environmental insults." Inflamm Bowel Dis **15**(5): 684-96.
- Stephens, R. H., Tanianis-Hughes, J., Higgs, N. B., Humphrey, M. und Warhurst, G. (2002). "Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a*(-/-) mouse intestine." J Pharmacol Exp Ther **303**(3): 1095-101.
- Strober, W. und Fuss, I. J. (2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1756-67.
- Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S. und Mori, S. (1988). "Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16." Cancer Res **48**(7): 1926-9.
- Takeda, K. und Akira, S. (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- Taupin, D. und Podolsky, D. K. (2003). "Trefoil factors: initiators of mucosal healing." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 721-32.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. und Willingham, M. C. (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-8.
- Tomita, T., Kanai, T., Fujii, T., Nemoto, Y., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Totsuka, T., Sakamoto, N., Akira, S. und Watanabe, M. (2008). "MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis." J Immunol **180**(8): 5291-9.
- Trinchieri, G. (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells." Immunol Today **14**(7): 335-8.
- Trinchieri, G. (1994). "Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes." Blood **84**(12): 4008-27.
- Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." Nat Rev Immunol **9**(11): 799-809.
- Turunen, U. M., Farkkila, M. A., Hakala, K., Seppala, K., Sivonen, A., Ogren, M., Vuoristo, M., Valtonen, V. V. und Miettinen, T. A. (1998). "Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study." Gastroenterology **115**(5): 1072-8.

- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. und Aderem, A. (1999). "The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens." Nature **401**(6755): 811-5.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Buller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B. und Einerhand, A. W. (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." Gastroenterology **131**(1): 117-29.
- Viguier, M., Guigue, P., Pages, C., Smahi, A. und Bachelez, H. (2010). "Successful treatment of generalized pustular psoriasis with the interleukin-1-receptor antagonist Anakinra: lack of correlation with IL1RN mutations." Ann Intern Med **153**(1): 66-7.
- Villani, A. C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M. S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Fortin, P. R., Wither, J. E., Sarfati, M., Rutgeerts, P., Rioux, J. D., Vermeire, S., Hudson, T. J. und Franchimont, D. (2009). "Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility." Nat Genet **41**(1): 71-6.
- Warren, S. und Sommers, S. C. (1949). "Pathogenesis of ulcerative colitis." Am J Pathol **25**(4): 657-79.
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., Nishimoto, H., Ishikawa, H., Hata, J. und Hibi, T. (1998). "Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa." J Exp Med **187**(3): 389-402.
- Waterhouse, C. C., Joseph, R. R., Winsor, G. L., Lacombe, T. A. und Stadnyk, A. W. (2001). "Monocyte chemoattractant protein-1 production by intestinal epithelial cells in vitro: a role for p38 in epithelial chemokine expression." J Interferon Cytokine Res **21**(4): 223-30.
- Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F. und Bevins, C. L. (2005). "Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18129-34.
- Wilk, J. N., Bilsborough, J. und Viney, J. L. (2005). "The *mdr1a*^{-/-} mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease." Immunol Res **31**(2): 151-9.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. und Neurath, M. F. (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-6.
- Xavier, R. J. und Podolsky, D. K. (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **448**(7152): 427-34.
- Yang, S. K., Eckmann, L., Panja, A. und Kagnoff, M. F. (1997). "Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells." Gastroenterology **113**(4): 1214-23.
- Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M. und Kanneganti, T. D. (2010). "The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis." Immunity **32**(3): 379-91.

Danksagungen

Ich möchte mich bei Vielen für ihre Hilfe und Unterstützung während meiner Promotion bedanken:

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Gerken und Prof. Dr. Elke Cario für die Möglichkeit zur Promotion bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Elke Cario für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu arbeiten, für die intensive und persönliche Betreuung, für hilfreiche Diskussionen und Denkanstöße, für die Möglichkeit, meine Daten auf zahlreichen internationalen Kongressen zu präsentieren und zu veröffentlichen und für die große Bereitschaft zum Gedankenaustausch innerhalb der Arbeitsgruppe.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Bertram Opalka für die Übernahme der Zweitkorrektur und für die Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen für die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere Annette Eyking und Frederike Bartsch danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft und die großartige Labor-Atmosphäre.

Dr. med. Joachim Göthert und Stephanie Weber aus der Hämatologie möchte ich für die technische Durchführung der intrazellulären FACS-Färbung und die Bereitstellung des FACS-Gerätes danken.

Außerdem geht ein weiterer ganz herzlicher Dank an Marc Schlegel, der mir während der gesamten Phase meiner Promotion zur Seite stand und mich immer motivieren konnte.

Schließlich gilt mein großer Dank meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben, mich fortwährend unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben.

DANKE!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Rolle des angeborenen Immunsystems in der Colitispathogenese bei MDR1A-Defizienz“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Dipl. Biol. Birgit Ey befürworte.

Essen, den _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____